(19)日本国特許庁(JP)　(12)公表特許公報(A)　(11)特許出願公表番号
特表2011-526786
(P2011-526786A)
(43)公表日　平成23年10月20日(2011.10.20)

(51)Int.Cl.	F I	テーマコード（参考）
C12N 5/0735 (2010.01)	C12N　5/00　202C	4B065

審査請求 未請求　予備審査請求 未請求　（全 155 頁）

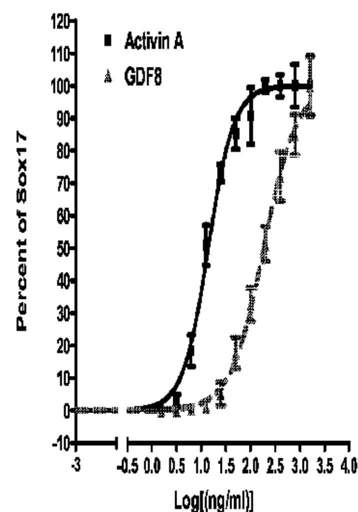
(21)出願番号	特願2011-516798 (P2011-516798)
(86)(22)出願日	平成21年6月30日 (2009.6.30)
(85)翻訳文提出日	平成23年2月24日 (2011.2.24)
(86)国際出願番号	PCT/US2009/049183
(87)国際公開番号	WO2010/002846
(87)国際公開日	平成22年1月7日 (2010.1.7)
(31)優先権主張番号	61/076,908
(32)優先日	平成20年6月30日 (2008.6.30)
(33)優先権主張国	米国 (US)
(31)優先権主張番号	61/076,900
(32)優先日	平成20年6月30日 (2008.6.30)
(33)優先権主張国	米国 (US)
(31)優先権主張番号	61/076,915
(32)優先日	平成20年6月30日 (2008.6.30)
(33)優先権主張国	米国 (US)

(71)出願人　509087759
セントコア・オーソ・バイオテツク・インコーポレーテツド
アメリカ合衆国ペンシルベニア州１９０４４ホーシヤム・リツジビユードライブ８００／８５０
(74)代理人　110000741
特許業務法人小田島特許事務所
(72)発明者　リウ，ジアジアン
アメリカ合衆国ニユージヤージイ州０８５５８スキルマン・グランドビユーロード１９９

最終頁に続く

(54)【発明の名称】多能性幹細胞の分化

(57)【要約】
本発明は、多能性幹細胞を分化させる方法を目的とする。具体的には本発明は、多能性幹細胞を胚体内胚葉系に特徴的なマーカーを発現している細胞へと分化させるのに十分な量のＧＤＦ－８を含有する培地中で、多能性幹細胞を培養することを含む、多能性幹細胞を胚体内胚葉細胞に特徴的なマーカーを発現している細胞へと分化させるための方法及び組成物を目的とする。



【特許請求の範囲】
【請求項１】
多能性幹細胞を胚体内胚葉系に特徴的なマーカーを発現している細胞へと分化させるのに十分な時間にわたって、アクチビンＡ不含であり、かつＥＧＦ、ＦＧＦ４、ＰＤＧＦ－Ａ、ＰＤＧＦ－Ｂ、ＰＤＧＦ－Ｃ、ＰＤＧＦ－Ｄ、ＶＥＧＦ、ＧＤＦ－８、ムシモール、ＰＤ９８０５９、ＬＹ２９４００２、Ｕ０１２４、Ｕ０１２６及び酪酸ナトリウムからなる群から選択される化合物を含有している培地で、前記多能性幹細胞を処理することを含む、多能性幹細胞を胚体内胚葉系に特徴的なマーカーを発現している細胞へと分化させるための方法。
【請求項２】
前記アクチビンＡ不含培地がまた、アニリンーピリジノトリアジン及び環式アニリンーピリジノトリアジンからなる群から選択される少なくとも１つの他の化合物を含有する、請求項１に記載の方法。
【発明の詳細な説明】
【技術分野】
【０００１】
（関連出願の相互参照）
本発明は、出願公開番号第６１／０７６，９００号（２００８年6月３０日出願）、出願公開番号第６１／０７６，９０８号（２００８年6月３０日出願）、並びに出願公開番号第６１／０７６，９１５号（２００８年6月３０日出願）に対する優先権を請求する。
【０００２】
（発明の分野）
本発明は、多能性幹細胞を分化させる方法を目的とする。具体的には本発明は、多能性幹細胞を胚体内胚葉系（definitive endoderm lineage）に特徴的なマーカーを発現している細胞へと分化させるのに十分な量のＧＤＦ－８を含む培地中で、多能性幹細胞を培養することを含む、多能性幹細胞を胚体内胚葉に特徴的なマーカーを発現している細胞へと分化させるための方法及び組成物を目的とする。
【背景技術】
【０００３】
１型糖尿病の細胞置換療法における進歩及び移植可能なランゲルハンス島の不足のため、生着に適したインスリン産生細胞すなわちβ細胞の供給源の開発に注目が集まっている。１つの手法は、例えば、胚性幹細胞のような多能性幹細胞から機能性のβ細胞を生成させることである。
【０００４】
脊椎動物の胚発生において、多能性細胞は、原腸形成として公知のプロセスにて、３つの胚葉（外胚葉、中胚葉、及び内胚葉）を含む細胞のグループを生じる。例えば、甲状腺、胸腺、膵臓、腸、及び肝臓等の組織は、内胚葉から中間ステージを経て発達する。このプロセスにおける中間ステージは、胚体内胚葉の形成である。胚体内胚葉細胞は、例えばＨＮＦ－３β、ＧＡＴＡ４、ＭＩＸＬ１、ＣＸＣＲ４及びＳＯＸ１７などの多くのマーカーを発現する。
【０００５】
膵臓の形成は、胚体内胚葉の膵臓内胚葉への分化により起こる。膵臓内胚葉の細胞は膵臓－十二指腸ホメオボックス遺伝子、ＰＤＸ１を発現する。ＰＤＸ１が存在しない場合、膵臓は、腹側芽及び背側芽の形成を越えて発達しない。したがって、ＰＤＸ１の発現は、膵臓器官形成において重要な工程となっている。成熟した膵臓は、他の細胞型の中でも、外分泌組織及び内分泌組織を含有する。外分泌組織及び内分泌組織は、膵臓内胚葉の分化によって生じる。
【０００６】
島細胞の特徴を保持する細胞がマウスの胚細胞から誘導されたことが報告されている。例えば、Ｌｕｍｅｌｓｋｙら（Ｓｃｉｅｎｃｅ　２９２：１３８９、２００１年）は、マ

ウスの胚性幹細胞の、膵島と同様のインスリン分泌構造への分化を報告している。Ｓｏｒｉａら（Ｄｉａｂｅｔｅｓ　４９：１５７、２０００年）は、ストレプトゾトシン糖尿病のマウスにおいて、マウスの胚性幹細胞から誘導されたインスリン分泌細胞が糖血症を正常化することを報告している。

【０００７】

一例において、ホリ（Ｈｏｒｉ）ら（ＰＮＡＳ　９９：１６１０５、２００２年）は、ホスホイノシチド３−キナーゼの阻害剤（ＬＹ２９４００２）でマウス胚性幹細胞を処理することにより、β細胞に類似した細胞が生じたことを開示している。

【０００８】

他の例では、Ｂｌｙｓｚｃｚｕｋら（ＰＮＡＳ　１００：９９８、２００３年）が、Ｐａｘ４を構成的に発現しているマウス胚性幹細胞からのインスリン産生細胞の生成を報告している。

【０００９】

Ｍｉｃａｌｌｅｆらは、レチノイン酸が、胚性幹細胞のＰｄｘ１陽性膵臓内胚葉の形成に対する関与を制御できることを報告している。レチノイン酸は、胚における原腸形成の終了時に対応する期間中の、胚性幹細胞分化の４日目に培養液に添加されると、Ｐｄｘ１発現の誘発に最も効果的である（Ｄｉａｂｅｔｅｓ　５４：３０１、２００５年）。

【００１０】

Ｍｉｙａｚａｋｉらは、Ｐｄｘ１を過剰発現しているマウス胚性幹細胞株を報告している。Ｍｉｙａｚａｋｉらの結果は、外因性のＰｄｘ１発現が、得られた分化細胞内でインスリン、ソマトスタチン、グルコキナーゼ、ニューロゲニン３、ｐ４８、Ｐａｘ６、及びＨＮＦ６遺伝子の発現を明らかに増加させたことを示している（Ｄｉａｂｅｔｅｓ　５３：１０３０、２００４年）。

【００１１】

Ｓｋｏｕｄｙらは、マウス胚性幹細胞内で、アクチビンＡ（ＴＧＦβスーパーファミリーのメンバー）が、膵臓外分泌遺伝子（ｐ４８及びアミラーゼ）、並びに内分泌遺伝子（Ｐｄｘ１、インスリン及びグルカゴン）の発現を上方制御することを報告している。

【００１２】

最大の効果は、１ｎＭアクチビンＡを使用しときに観察された。Ｓｋｏｕｄｙらはまた、インスリン及びＰｄｘ１　ｍＲＮＡの発現レベルはレチノイン酸により影響されなかったが、３ｎＭ　ＦＧＦ７での処理によりＰｄｘ１の転写産物のレベルが増大したことも観察している（Ｂｉｏｃｈｅｍ．Ｊ．３７９：７４９、２００４年）。

【００１３】

Ｓｈｉｒａｋｉらは、胚性幹細胞のＰｄｘ１陽性細胞への分化を特異的に増大させる増殖因子の効果を研究した。Ｓｈｉｒａｋｉらは、ＴＧＦβ２が、Ｐｄｘ１陽性細胞のより高い割合を再現性よく生み出すことを観察した（Ｇｅｎｅｓ　Ｃｅｌｌｓ．２００５年６月、１０（６）：５０３〜１６）。

【００１４】

Ｇｏｒｄｏｎらは、血清の不在下、及びアクチビンとＷｎｔシグナル伝達阻害剤の存在下での、マウス胚性幹細胞からの短尾奇形［陽性］／ＨＮＦ−３β［陽性］内胚葉細胞の誘発を示した（米国特許第２００６／０００３４４６Ａ　１号）。

【００１５】

Ｇｏｒｄｏｎら（ＰＮＡＳ、Ｖｏｌ　１０３、１６８０６ページ、２００６年）は、「Ｗｎｔ及びＴＧＦ−β／ｎｏｄａｌ／アクチビンシグナル伝達は、前側の原始線条の生成のために同時に必要である」と述べている。

【００１６】

しかしながら、胚性幹細胞発達のマウスモデルは、例えば、ヒト等のより高等な哺乳動物における発達プログラムを正確には模倣しない恐れがある。

【００１７】

Ｔｈｏｍｓｏｎらは、ヒト胚盤胞から胚性幹細胞を単離した（Ｓｃｉｅｎｃｅ　２８２

：１１４、１９９８年）。同時に、Ｇｅａｒｈａｒｔ及び共同研究者は、胎児性腺組織から、ヒト胚性生殖（ｈＥＧ）細胞株を誘導した（Ｓｈａｍｂｌｏｔｔら、Ｐｒｏｃ．Ｎａｔｌ．Ａｃａｄ．Ｓｃｉ．ＵＳＡ　９５：１３７２６、１９９８年）。白血病抑制因子（ＬＩＦ）と共に培養するのみでも分化を阻止し得るマウス胚性幹細胞とは異なり、ヒト胚性幹細胞は、非常に特殊な条件下で維持する必要がある（米国特許第６，２００，８０６号、国際公開第９９／２０７４１号；同第０１／５１６１６号）。

【００１８】

Ｄ’Ａｍｏｕｒらは、高濃度のアクチビン及び低濃度の血清の存在下でのヒト胚性幹細胞由来の胚体内胚葉の濃縮培地の生成を記載している（Ｄ’Ａｍｏｕｒ　Ｋ　Ａら、２００５年）。これらの細胞を、マウスの腎臓被膜下に移植することにより、一部の内胚葉性器官の特徴を有する、より成熟した細胞への分化が得られた。ヒト胚性幹細胞由来の胚体内胚葉細胞は、ＦＧＦ－１０の添加後、ＰＤＸ１陽性細胞に更に分化することができる（米国特許出願公開第２００５／０２６６５５４Ａ１号）。

【００１９】

Ｄ’Ａｍｏｕｒら（Ｎａｔｕｒｅ　Ｂｉｏｔｅｃｈｎｏｌｏｇｙ－２４、１３９２～１４０１（２００６年））は、「我々はヒト胚性幹（ｈＥＳ）細胞を、膵臓ホルモンインスリン、グルカゴン、ソマトスタチン、膵臓ポリペプチド及びグレリンを合成できる内分泌細胞へと変換する分化プロセスを開発した。このプロセスは、胚体内胚葉、腸管内胚葉、膵臓内胚葉及び内分泌前駆細胞に似たステージを経て、内分泌ホルモンを発現する細胞に細胞を誘導することによりインビボで膵臓の器官形成を模倣するものである。」と述べている。

【００２０】

別の例において、Ｆｉｓｋらは、ヒト胚性幹細胞から膵島細胞を産生するシステムを報告している（米国特許出願公開第２００６／００４０３８７Ａ１号）。この場合、分化経路は３つのステージに分割された。最初に、ｎ－ブチレートとアクチビンＡとの組み合わせを使用して、ヒト胚性幹細胞を内胚葉に分化させた。次に細胞をノギンなどのＴＧＦ－βアンタゴニストとＥＧＦ又はベータセルリンの組み合わせと培養してＰＤＸ１陽性細胞を生成する。最終分化は、ニコチンアミドにより誘発された。

【００２１】

１つの例において、Ｂｅｎｖｅｎｉｓｔｒｙらは、「我々は、ＰＤＸ１の過剰発現が、膵臓に多く見られる遺伝子の発現を増加させたことを結論付けた。すなわちインスリン発現の誘導は、インビボでのみ存在する更なるシグナルを必要とする可能性がある。」と述べている（Ｂｅｎｖｅｎｉｓｔｒｙ　ｅｔ　ａｌ，Ｓｔｅｍ　Ｃｅｌｌｓ　２００６；２４：１９２３～１９３０）。

【００２２】

アクチビンＡは、細胞増殖及び分化の制御、並びに神経生存の促進を含む、広範な生物活性を呈するＴＧＦ－βファミリーのメンバーである。アクチビンＡの単離及び精製は、多くの場合複雑であり、しばしば乏しい収率をもたらし得る。例えば、Ｐａｎｇａｓ，Ｓ．Ａ．及びＷｏｏｄｒｕｆｆ，Ｔ．Ｋは、「インヒビン及びアクチビンは、下垂体ＦＳＨ分泌の制御を含む多様な生理的役割を有するタンパク質ホルモンである。トランスフォーミング増殖因子－β遺伝子ファミリーの他のメンバーと同様、それらはより大きな前駆体分子からプロセシングを受け、また機能的二量体へとアセンブリさせられる。天然源からのインヒビン及びアクチビンの単離では、限られた量の生理活性タンパク質しか生成されない。」と記載している（Ｊ．Ｅｎｄｏｃｒｉｎｏｌ．１７２（２００２）１９９～２１０）。

【００２３】

他の例では、Ａｒａｉ，Ｋ．Ｙ．らは、「アクチビンはトランスフォーミング増殖因子－βスーパーファミリーに属する多機能性増殖因子である。天然源からのアクチビンの単離は多工程を必要とし、限られた量しか生成されない。近年の研究で用いられている組み換え体調製法でさえも、アクチビン組み換え体の精製には未だに多工程を必要とする。」

と記載している（Ｐｒｏｔｅｉｎ　Ｅｘｐｒｅｓｓｉｏｎ　ａｎｄ　Ｐｕｒｉｆｉｃａｔｉｏｎ　４９（２００６）７８～８２）。
【発明の概要】
【発明が解決しようとする課題】
【００２４】
　したがって、多能性幹細胞の分化を促進するためのアクチビンＡの代替物に対する有意な必要性が未だに存在している。
【課題を解決するための手段】
【００２５】
　一実施形態では、本発明は、多能性幹細胞を胚体内胚葉系に特徴的なマーカーを発現している細胞へと分化させるのに十分な量のＧＤＦ－８を含む培地中で、多能性幹細胞を培養することを含む、多能性幹細胞を胚体内胚葉系に特徴的なマーカーを発現している細胞へと分化させる方法を提供する。
【００２６】
　一実施形態では、十分な量のＧＤＦ－８を含む培地はまた、少なくとも１つの他の化合物を含有する。一実施形態では、少なくとも１つの他の化合物は、アニリン－ピリジノトリアジン（aniline-pyridinotriazine）である。別の実施形態では、少なくとも１つの他の化合物は環式アニリン－ピリジノトリアジンである。
【図面の簡単な説明】
【００２７】
【図１】胚体内胚葉系に特徴的なマーカーを発現している細胞へのＨ１ヒト胚性幹細胞の分化を示す。分化は、ＩＮ　Ｃｅｌｌ　Ａｎａｌｙｚｅｒ　１０００（ＧＥ　Ｈｅａｌｔｈｃａｒｅ）を用いて細胞数（パネルＡ）とＳＯＸ１７強度（パネルＢ）を計測することで判定した。ヒト胚性幹細胞は、２０ｎｇ／ｍＬのＷｎｔ３ａに加え表示された濃度でアクチビンＡを含有している培地（黒いバー）、又はＷｎｔ３ａは含まないが表示された濃度でアクチビンＡを含む培地（白いバー）で、全部で４日間にわたって処理した。
【図２】ヒト胚性幹細胞株Ｈ１の細胞を、胚体内胚葉系に特徴的なマーカーを発現している細胞へと分化させるために使用されたアクチビンＡ及びＧＤＦ８の用量反応相関を示す。アッセイの初日に、記載の濃度のアクチビンＡ又はＧＤＦ８を２０ｎｇ／ｍＬのＷｎｔ３ａと組み合わせたもので、全部で３日間にわたって細胞を処理した。分化は、蛍光抗体プローブと、ＧＥ　Ｈｅａｌｔｈｃａｒｅ　ＩＮ　Ｃｅｌｌ　Ａｎａｌｙｚｅｒでのハイコンテンツな解析とを用いて、ＳＯＸ１７強度を測定することで判定した。
【図３】実施例１２に記載の方法に従う分化の第１工程後の細胞でのＣＸＣＲ４の発現を示す。初日に２０ｎｇ／ｍＬのＷｎｔ３ａと組み合わせるか、あるいは3日間全てにわたって２．５μＭの化合物３４又は２．５μＭの化合物５６と組み合わせるかして、１００ｎｇ／ｍＬのアクチビンＡ又は２００ｎｇ／ｍＬのＧＤＦ－８で全部で３日間にわたってＨ１細胞を処理した。蛍光抗体プローブとフローサイトメトリーとを用いてＣＸＣＲ４発現を測定し、記載の陽性細胞の百分率を算出した。
【図４】実施例１２に記載の方法に従い胚体内胚葉へと３日間にわたって分化させた後の細胞でのＳＯＸ１７発現を示す。初日に２０ｎｇ／ｍＬのＷｎｔ３ａと組み合わせるか、あるいは3日間全てにわたって２．５μＭの化合物３４又は２．５μＭの化合物５６と組み合わせるかして、１００ｎｇ／ｍＬのアクチビンＡ又は２００ｎｇ／ｍＬのＧＤＦ－８で全部で３日間にわたってＨ１細胞を処理した。分化は、蛍光抗体プローブと、ＧＥ　Ｈｅａｌｔｈｃａｒｅ　ＩＮ　Ｃｅｌｌ　Ａｎａｌｙｚｅｒでのハイコンテンツな解析とを用いて、ＳＯＸ１７強度（黒色バー）と得られた細胞数（白色バー）を測定することで判定した。
【図５】実施例１２に記載の方法に従う分化の第３工程後の細胞での、ＰＤＸ１タンパク質及びＣＤＸ２タンパク質の発現を示す。初日に２０ｎｇ／ｍＬのＷｎｔ３ａと組み合わせるか、あるいは3日間全てにわたって２．５μＭの化合物３４又は２．５μＭの化合物５６と組み合わせるかして、１００ｎｇ／ｍＬのアクチビンＡ又は２００ｎｇ／ｍＬのＧ

ＤＦ－８で全部で３日間にわたってＨ１細胞を処理し、続いて分化の第２及び第３工程を介して分化させた。蛍光抗体プローブ及びハイコンテンツな解析で測定されたタンパク質発現及び細胞数を各処理群について記載する。比較目的のため、値をアクチビンＡ／Ｗｎｔ３ａでの処理に対して正規化する。

【図６】実施例１２に記載の方法に従う、分化の第４工程後の細胞における、ＰＤＸ１タンパク質の発現（白色バー）及び細胞数（黒色バー）を示す。初日に２０ｎｇ／ｍＬのＷｎｔ３ａと組み合わせるか、あるいは３日間全てにわたって２．５μＭの化合物３４又は２．５μＭの化合物５６と組み合わせるかして、１００ｎｇ／ｍＬのアクチビンＡ又は２００ｎｇ／ｍＬのＧＤＦ－８で全部で３日間にわたってＨ１細胞を処理し、続いて分化の第２、第３及び第４工程を介して分化させた。蛍光抗体プローブ及びハイコンテンツな解析で測定されたタンパク質発現及び細胞数を各処理群について記載する。比較目的のため、値をアクチビンＡ／Ｗｎｔ３ａでの処理に対して正規化する。

【図７】実施例１２に記載の方法に従って分化させた細胞における、インスリン及びグルカゴンのタンパク質発現、並びに細胞数を示す。初日に２０ｎｇ／ｍＬのＷｎｔ３ａと組み合わせるか、あるいは３日間全てにわたって２．５μＭの化合物３４又は２．５μＭの化合物５６と組み合わせるかして、１００ｎｇ／ｍＬのアクチビンＡ又は２００ｎｇ／ｍＬのＧＤＦ－８で全部で３日間にわたってＨ１細胞を処理し、続いて分化の第２、第３、第４及び第５工程を介して分化させる。蛍光抗体プローブ及びハイコンテンツな解析で測定されたタンパク質発現及び細胞数を各処理群について示す。比較目的のため、値をアクチビンＡ／Ｗｎｔ３ａでの処理に対して正規化する。

【図８】実施例１３に記載の方法に従って胚体内胚葉へと分化させた後のヒト胚性幹細胞におけるＳＯＸ１７タンパク質発現及び細胞数を示す。初日に２０ｎｇ／ｍＬのＷｎｔ３ａと組み合わせるか、あるいはアッセイの最初の２日間にわたって２．５μＭの化合物３４又は２．５μＭの化合物５６と組み合わせるかして、１００ｎｇ／ｍＬのアクチビンＡ又は１００ｎｇ／ｍＬのＧＤＦ－増殖因子で全部で４日間にわたってＨ１細胞を処理した。蛍光抗体プローブ及びハイコンテンツな解析で測定されたＳＯＸ１７タンパク質発現（黒色バー）及び細胞数（白色バー）を各処理群について記載する。比較目的のため、値をアクチビンＡ／Ｗｎｔ３ａでの処理に対して正規化する。パネル８Ａは、いずれの増殖因子も含まない条件（ＮＯＮＥ）、あるいはアクチビンＡ／Ｗｎｔ３ａ処理を備える条件（ＡＡ／Ｗｎｔ３ａ）又はそれぞれの試薬単独での条件、での分化のための一連の対照条件を示す。パネル８Ｂは、単独での、又はＷｎｔ３ａ、化合物３４若しくは化合物５６との複数種の組み合わせでのＧＤＦ－３による分化を示す。パネル８Ｃは、単独での、又はＷｎｔ３ａ、化合物３４若しくは化合物５６との複数種の組み合わせでのＧＤＦ－５による分化を示す。パネル８Ｄは、単独での、又はＷｎｔ３ａ、化合物３４若しくは化合物５６との複数種の組み合わせでのＧＤＦ－８による分化を示す。パネル８Ｅは、単独での、又はＷｎｔ３ａ、化合物３４若しくは化合物５６との複数種の組み合わせでのＧＤＦ－１０による分化を示す。パネル８Ｆは、単独での、又はＷｎｔ３ａ、化合物３４若しくは化合物５６との複数種の組み合わせでのＧＤＦ－１１による分化を示す。パネル８Ｇは、単独での又はＷｎｔ３ａ、化合物３４若しくは化合物５６との複数種の組み合わせでのＧＤＦ－１５による分化を示す。

【図９】実施例１４に記載の方法に従って胚体内胚葉へと分化させた後のヒト胚性幹細胞におけるＳＯＸ１７タンパク質発現を示す。全部で３日間にわたって、１００ｎｇ／ｍＬのアクチビンＡで、あるいはアッセイの初日に、記載の濃度で２０ｎｇ／ｍＬのＷｎｔ３ａ又は２．５μＭの化合物３４と組み合わせた様々な増殖因子で、Ｈ１細胞を処理した。蛍光抗体プローブ及びハイコンテンツな解析で測定されたＳＯＸ１７タンパク質発現（黒色バー）及び細胞数（白色バー）を各処理群について記載する。比較目的のため、値をアクチビンＡ／Ｗｎｔ３ａでの処理に対して正規化する。パネル９Ａは、Ｗｎｔ３ａ単独での、あるいはいずれの増殖因子も含まない条件（Ｎｏｎｅ）又はアクチビンＡ／Ｗｎｔ３ａ処理を備える条件（ＡＡ／Ｗｎｔ３ａ）での分化についての、一連の対照条件を示す。パネル９Ｂは、２０ｎｇ／ｍＬのＷｎｔ３ａと組み合わせての、記載の濃度でのＧＤＦ－

８（製造供給元ＰｅｐｒｏＴｅｃｈ）による分化を示す。パネル９Ｃは、２０ｎｇ／ｍＬのＷｎｔ３ａと組み合わせての、記載の濃度でのＧＤＦ－８（製造供給元Ｓｈｅｎｅｎｄｏａｈ）による分化を示す。パネル９Ｄは、Ｗｎｔ３ａ又は化合物３４との複数種の組み合わせでの、記載の濃度でのＴＧＦβ１による分化を示す。パネル９Ｅは、Ｗｎｔ３ａ又は化合物３４との複数種の組み合わせでの、記載の濃度でのＢＭＰ２による分化を示す。パネル９Ｆは、Ｗｎｔ３ａ又は化合物３４との複数種の組み合わせでの、記載の濃度でのＢＭＰ３による分化を示す。パネル９Ｇは、Ｗｎｔ３ａ又は化合物３４との複数種の組み合わせでの、記載の濃度でのＢＭＰ４による分化を示す。

【図１０】実施例１５に記載の方法に従って胚体内胚葉へと分化させた後のヒト胚性幹細胞におけるＳＯＸ１７タンパク質発現を示す。１００ｎｇ／ｍＬのアクチビンＡ又は１００ｎｇ／ｍＬのＧＤＦ－８を２０ｎｇ／ｍＬのＷｎｔ３ａと組み合わせて、全部で３日間にわたって様々に設定された曝露時間でＨ１細胞を処理した。蛍光抗体プローブ及びハイコンテンツな解析で測定されるＳＯＸ１７タンパク質発現は、増殖因子が添加されない（未処理）か、Ｗｎｔ３ａ単独、アクチビンＡ若しくはＧＤＦ－８単独、又はアクチビンＡ／Ｗｎｔ３ａ処理若しくはＧＤＦ－８／Ｗｎｔ３ａ処理での分化に対する対照条件を試験する各処理群についての総強度値として示され、Ｗｎｔ３ａは、記載のようにアッセイの初日のみに添加した、又はアッセイの全３日間にわたって添加した。

【図１１】実施例１５に記載の方法に従って胚体内胚葉へと分化させた後のヒト胚性幹細胞におけるＳＯＸ１７タンパク質発現を示す。１００ｎｇ／ｍＬのアクチビンＡを、試験化合物（化合物１８１（パネルＡ）、化合物１８０（パネルＢ）、化合物１９（パネルＣ）、化合物２０２（パネルＤ）、化合物４０（パネルＥ）、化合物３４（パネルＦ）、又はＧＳＫ３インヒビターＢＩＯ（パネルＧ））と記載の濃度で組み合わせて、３日間全てにわたって、様々に設定された曝露時間でＨ１細胞を処理し、ここで試験化合物はアッセイの初日にのみ添加した。蛍光抗体プローブ及びハイコンテンツな解析で測定されたＳＯＸ１７のタンパク質発現を、総強度値で記載する。

【図１２】実施例１５に記載の方法に従って胚体内胚葉へと分化させた後のヒト胚性幹細胞におけるＳＯＸ１７タンパク質発現を示す。１００ｎｇ／ｍＬのアクチビンＡを、試験化合物（化合物１８１（パネルＡ）、化合物１８０（パネルＢ）、化合物１９（パネルＣ）、化合物２０２（パネルＤ）、化合物４０（パネルＥ）、化合物３４（パネルＦ）、又はＧＳＫ３インヒビターＢＩＯ（パネルＧ））と記載の濃度で組み合わせて、全部で３日間にわたって、様々に設定された曝露時間でＨ１細胞を処理し、ここで試験化合物はアッセイの３日間全てにわたって添加した。蛍光抗体プローブ及びハイコンテンツな解析で測定されたＳＯＸ１７のタンパク質発現を、総強度値で記載する。

【図１３】実施例１５に記載の方法に従って胚体内胚葉へと分化させた後のヒト胚性幹細胞におけるＳＯＸ１７タンパク質発現を示す。１００ｎｇ／ｍＬのＧＤＦ－８を、試験化合物（化合物１８１（パネルＡ）、化合物１８０（パネルＢ）、化合物１９（パネルＣ）、化合物２０２（パネルＤ）、化合物４０（パネルＥ）、化合物３４（パネルＦ）、又はＧＳＫ３インヒビターＢＩＯ（パネルＧ））と記載の濃度で組み合わせて、３日間全てにわたって、様々に設定された曝露時間でＨ１細胞を処理し、ここで試験化合物はアッセイの初日にのみ添加した。蛍光抗体プローブ及びハイコンテンツな解析で測定されたＳＯＸ１７のタンパク質発現を、総強度値で記載する。

【図１４】実施例１５に記載の方法に従って胚体内胚葉へと分化させた後のヒト胚性幹細胞におけるＳＯＸ１７タンパク質発現を示す。１００ｎｇ／ｍＬのＧＤＦ－８を、試験化合物（化合物１８１（パネルＡ）、化合物１８０（パネルＢ）、化合物１９（パネルＣ）、化合物２０２（パネルＤ）、化合物４０（パネルＥ）、化合物３４（パネルＦ）、又はＧＳＫ３インヒビターＢＩＯ（パネルＧ））と記載の濃度で組み合わせて、全部で３日間にわたって、様々に設定された曝露時間でＨ１細胞を処理し、ここで試験化合物はアッセイの３日間全てにわたって添加した。蛍光抗体プローブ及びハイコンテンツな解析で測定されたＳＯＸ１７のタンパク質発現を、総強度値で記載する。

【図１５】実施例１５に記載の方法に従ってヒト胚性幹細胞を胚体内胚葉へと分化させた

後に得られた細胞数を示す。１００ｎｇ／ｍＬのアクチビンＡ又は１００ｎｇ／ｍＬのＧＤＦ－８を２０ｎｇ／ｍＬのＷｎｔ３ａと組み合わせて、全部で３日間にわたって様々に設定された曝露時間でＨ１細胞を処理した。蛍光核プローブ及びハイコンテンツな解析で測定される細胞数は、増殖因子が添加されない（未処理）か、Ｗｎｔ３ａ単独、アクチビンＡ若しくはＧＤＦ－８単独、又はアクチビンＡ／Ｗｎｔ３ａ処理若しくはＧＤＦ－８／Ｗｎｔ３ａ処理での分化に対する対照条件を試験する各処理群について示され、Ｗｎｔ３ａは、記載のようにアッセイの初日のみに添加した、又はアッセイの全３日間にわたって添加した。

【図１６】実施例１５に記載の方法に従ってヒト胚性幹細胞を胚体内胚葉へと分化させた後に得られた細胞数を示す。１００ｎｇ／ｍＬのアクチビンＡを、試験化合物（化合物１８１（パネルＡ）、化合物１８０（パネルＢ）、化合物１９（パネルＣ）、化合物２０２（パネルＤ）、化合物４０（パネルＥ）、化合物３４（パネルＦ）、又はＧＳＫ３インヒビターＢＩＯ（パネルＧ））と記載の濃度で組み合わせて、３日間全てにわたって、様々に設定された曝露時間でＨ１細胞を処理し、ここで試験化合物はアッセイの初日にのみ添加した。蛍光核プローブ及びハイコンテンツな解析で測定された、得られた細胞数を示す。

【図１７】実施例１５に記載の方法に従ってヒト胚性幹細胞を胚体内胚葉へと分化させた後に得られた細胞数を示す。１００ｎｇ／ｍＬのアクチビンＡを、試験化合物（化合物１８１（パネルＡ）、化合物１８０（パネルＢ）、化合物１９（パネルＣ）、化合物２０２（パネルＤ）、化合物４０（パネルＥ）、化合物３４（パネルＦ）、又はＧＳＫ３インヒビターＢＩＯ（パネルＧ））と記載の濃度で組み合わせて、全部で３日間にわたって、様々に設定された曝露時間でＨ１細胞を処理し、ここで試験化合物はアッセイの３日間全てにわたって添加した。蛍光核プローブ及びハイコンテンツな解析で測定された、得られた細胞数を示す。

【図１８】実施例１５に記載の方法に従ってヒト胚性幹細胞を胚体内胚葉へと分化させた後に得られた細胞数を示す。１００ｎｇ／ｍＬのＧＤＦ－８を、試験化合物（化合物１８１（パネルＡ）、化合物１８０（パネルＢ）、化合物１９（パネルＣ）、化合物２０２（パネルＤ）、化合物４０（パネルＥ）、化合物３４（パネルＦ）、又はＧＳＫ３インヒビターＢＩＯ（パネルＧ））と記載の濃度で組み合わせて、３日間全てにわたって、様々に設定された曝露時間でＨ１細胞を処理し、ここで試験化合物はアッセイの初日にのみ添加した。蛍光核プローブ及びハイコンテンツな解析で測定された、得られた細胞数を示す。

【図１９】実施例１５に記載の方法に従ってヒト胚性幹細胞を胚体内胚葉へと分化させた後に得られた細胞数を示す。１００ｎｇ／ｍＬのＧＤＦ－８を、試験化合物（化合物１８１（パネルＡ）、化合物１８０（パネルＢ）、化合物１９（パネルＣ）、化合物２０２（パネルＤ）、化合物４０（パネルＥ）、化合物３４（パネルＦ）、又はＧＳＫ３インヒビターＢＩＯ（パネルＧ））と記載の濃度で組み合わせて、全部で３日間にわたって、様々に設定された曝露時間でＨ１細胞を処理し、ここで試験化合物はアッセイの３日間全てにわたって添加した。蛍光核プローブ及びハイコンテンツな解析で測定された、得られた細胞数を示す。

【図２０】実施例１６に記載の方法に従う分化の複数工程を通しての細胞における、様々なタンパク質マーカーの発現を示す。初日に２０ｎｇ／ｍＬのＷｎｔ３ａと組み合わせるか、あるいは初日のみに添加した２．５μＭの様々な化合物（化合物１９、化合物２０２、化合物４０又はＧＳＫ３インヒビターＢＩＯ）と組み合わせるかして、１００ｎｇ／ｍＬのアクチビンＡ又は１００ｎｇ／ｍＬのＧＤＦ－８によりＨ１細胞を全部で３日間にわたって処理した。図２０のパネルＡは、分化の第１工程後の細胞の、胚体内胚葉マーカーＣＸＣＲ４についてのＦＡＣＳ解析を示す。蛍光抗体プローブとフローサイトメトリーとを用いてＣＸＣＲ４発現を測定し、記載の陽性細胞の百分率を算出した。図２０のパネルＢは、記載の対応する処理を検査する、分化の第１工程から得られる正規化ＳＯＸ１７タンパク質発現についてのハイコンテンツな画像解析（黒色バー）及び回収細胞数（白色バー）を示す。図２０のパネルＣは、分化工程５を通して処理した培養物から回収された相

対的な細胞数についてのハイコンテンツな画像解析を示す。図２０のパネルＤは、分化工程５を通して処理した培養物からのグルカゴンタンパク質の発現についてのハイコンテンツな画像解析を示す。図２０のパネルＥは、分化工程５を通して処理した培養物からのインスリンタンパク質の発現についてのハイコンテンツな画像解析を示す。図２０のパネルＦは、第５分化工程を通して処理した培養物からの細胞中のグルカゴン対インスリン発現比を示す。比較目的のため、パネルＢ、Ｃ、Ｄ、Ｅ及びＦ中の発現値は、アクチビンＡ及びＷｎｔ３ａによる工程１時の対照処理に対して正規化してある。

【図２１】実施例１７に記載の方法に従う分化の複数工程後の細胞における、様々なタンパク質マーカー及びＲＴ－ＰＣＲマーカーの発現を示す。初日に２０ｎｇ／ｍＬのＷｎｔ３ａと組み合わせるか、あるいは初日のみに添加した様々な化合物（化合物１８１、化合物１８０、化合物１９、化合物２０２、化合物４０、化合物５６又はＧＳＫ３インヒビターＢＩＯ）と以下の濃度で組み合わせるかして、１００ｎｇ／ｍＬのアクチビンＡ又は１００ｎｇ／ｍＬのＧＤＦ－８によりＨ１細胞を全部で３日間にわたって処理した。胚体内胚葉マーカーのＣＸＣＲ４についてのＦＡＣＳ解析を、分化の第１工程後の細胞で示す。ここで処理は、アクチビンＡ（パネルＡ）又はＧＤＦ－８（パネルＢ）を、Ｗｎｔ３ａ又は様々な化合物と組み合わせた。蛍光抗体プローブとフローサイトメトリーとを用いてＣＸＣＲ４発現を測定し、記載の陽性細胞の百分率を算出した。図２１の後続のパネルで、以下のように分化の第１工程時にアクチビンＡ又はＧＤＦ－８を用いる各処理についての、様々な分化マーカーの正規化ＲＴ－ＰＣＲ値を示す：アクチビンＡ（パネルＣ）又はＧＤＦ－８（パネルＤ）と組み合わせる処理についての分化の第１工程の終了時のマーカー；アクチビンＡ（パネルＥ）又はＧＤＦ－８（パネルＦ）と組み合わせる処理についての分化の第３工程の終了時のマーカー；アクチビンＡ（パネルＧ）又はＧＤＦ－８（パネルＨ）と組み合わせる処理についての分化の第４工程の終了時のマーカー；アクチビンＡ（パネルＩ）又はＧＤＦ－８（パネルＪ）と組み合わせる処理についての分化の第５工程の終了時のマーカー。分化の第５工程の終了時にハイコンテンツな解析を実施して、分化の第１工程時にアクチビンＡ（パネルＫ）又はＧＤＦ－８（パネルＭ）を用いる対応する処理に対して、回収された細胞数を計測した。同様にハイコンテンツな解析を使用して、分化の第１工程時のアクチビンＡ（パネルＬ）又はＧＤＦ－８（パネルＮ）での処理と一致する、分化の第５工程の終了時に回収された細胞集団のグルカゴン及びインスリン強度を測定した。

【図２２】実施例１８に記載の方法に従って処理した細胞における、様々なタンパク質マーカー及びＲＴ－ＰＣＲマーカーの発現を示す。初日に２０ｎｇ／ｍＬのＷｎｔ３ａと組み合わせるか、あるいは初日のみに２．５μＭの化合物４０又は２．５μＭの化合物２０２と組み合わせるかして、１００ｎｇ／ｍＬのアクチビンＡ又は１００ｎｇ／ｍＬのＧＤＦ－８で全部で３日間にわたってＨ１細胞を処理した。図２２のパネルＡは、分化の第１工程後の細胞の、胚体内胚葉マーカーＣＸＣＲ４についてのＦＡＣＳ解析を示す。蛍光抗体プローブとフローサイトメトリーとを用いてＣＸＣＲ４発現を測定し、記載の陽性細胞の百分率を算出した。図２２のパネルＢは、分化の第４工程後に回収された細胞中の、様々な分化マーカーの正規化ＲＴ－ＰＣＲ値を、分化の第１工程時にアクチビンＡ／Ｗｎｔ３ａ又はＧＤＦ－８／化合物４０若しくはＧＤＦ－８／化合物２０２を用いる処理それぞれと対応させて示す。

【図２３】ＳＣＩＤ－ｂｅｉｇｅマウスで検出されたＣ－ペプチドレベルを示し、マウスには、実施例１８に記載の分化プロトコルの第４工程終了時の細胞を移植した。

【図２４】のパネルＡは、実施例１９に記載の分化プロトコルの第１工程の終了時の細胞についてのＦＡＣＳにより測定された、ＣＸＣＲ４の発現を示す。パネルＢは、実施例１９に記載の分化プロトコルの第４工程の終了時の細胞のＲＴ－ＰＣＲにより測定された、様々な遺伝子の発現を示す。それぞれ同一の治療プロトコルにかけられた、実験用の２つの異なる複製を示す（複製－１及び複製－２）。パネルＣは、ＳＣＩＤ－ｂｅｉｇｅマウスで検出されたＣ－ペプチドレベルを示し、マウスには、インビトロ分化の第１工程時にＧＤＦ－８とＷｎｔ３ａで処理する分化プロトコルの第４工程終了時の細胞を移植した。

パネルＤは、ＳＣＩＤ－ｂｅｉｇｅマウスで検出されたＣ－ペプチドレベルを示し、マウスには、インビトロ分化の第１工程時にＧＤＦ－８及び化合物２８で処理する分化プロトコルの第４工程の終了時の細胞を移植した。
【図２５】実施例２２に記載の本発明の方法に従って処理したマイクロキャリアビーズ上で増殖させた細胞の、細胞数（パネルＡ）及びＣＸＣＲ４の発現（パネルＢ）を示す。細胞は、処理なしで（分化させずに）、あるいは１００ｎｇ／ｍＬのアクチビンＡと２０ｎｇ／ｍＬのＷｎｔ３ａとを組み合わせた処理（ＡＡ／Ｗｎｔ３ａ）で、又は以下に記載のようにＧＤＦ－８と組み合わせた様々な処理で、Ｃｙｔｏｄｅｘ３ビーズ上で増殖させた：５０ｎｇ／ｍＬのＧＤＦ－８と２．５μＭの化合物３４（Ｃｍｐ　３４＋８）；又は５０ｎｇ／ｍＬのＧＤＦ－８と２．５μＭの化合物３４と５０ｎｇ／ｍＬのＰＤＧＦ（Ｃｍｐ　３４＋８＋Ｄ）；又は５０ｎｇ／ｍＬのＧＤＦ－８と２．５μＭの化合物３４と５０ｎｇ／ｍＬのＰＤＧＦと５０ｎｇ／ｍＬのＶＥＧＦ（Ｃｍｐ　３４＋８＋Ｄ＋Ｖ）；又は５０ｎｇ／ｍＬのＧＤＦ－８と２．５μＭの化合物３４と５０ｎｇ／ｍＬのＰＤＧＦと５０ｎｇ／ｍＬのＶＥＧＦと２０ｎｇ／ｍＬのムシモール（Ｃｍｐ　３４＋８＋Ｄ＋Ｖ＋Ｍ）。
【図２６】実施例２３に記載の本発明の化合物による処理後の細胞増殖を示す。パネルＢ～Ｉは、ＧＤＦ－８と組み合わせて化合物を使用する処理についてのアッセイの結果、及び、分化アッセイの開始後１日、２日及び３日時点でのＭＴＳ　ＯＤ読み取り測定値を示す。
【図２７】本発明の方法に従って処理したマイクロキャリアビーズ上で増殖した細胞の、様々なタンパク質及び遺伝子の発現を示す。パネルＡは、実施例２４に記載の分化プロトコルの第１工程の終了時の細胞についてのＦＡＣＳにより測定された、ＣＸＣＲ４、ＣＤ９９及びＣＤ９の発現の陽性パーセントを示す。パネルＢは、分化プロトコルの第３工程を通して分化したことが示された処理から回収された細胞を示す。パネルＣは、工程に示されるように処理し、プロトコルの第３工程を通して分化した細胞で発現した、様々な遺伝子マーカーのｄｄＣＴ値を示す。
【発明を実施するための形態】
【００２８】
開示を分かりやすくするため、限定を目的とすることなく、本発明の「発明を実施するための形態」を、本発明の特定の特徴、実施形態、又は応用を説明又は図示した以下の小項目に分ける。
【００２９】
定義
幹細胞は、単一の細胞レベルにて自己複製し、分化して後代細胞を生成する、それら両方の能力で定義される未分化細胞であり、後代細胞には、自己複製前駆細胞、非再生前駆細胞、及び最終分化細胞が含まれる。幹細胞はまた、インビトロで複数の胚葉（内胚葉、中胚葉及び外胚葉）から様々な細胞系の機能的細胞に分化する能力によって、また移植後に複数の胚葉の組織を生じ、胚盤胞への注入後、全部ではないとしても殆どの組織を提供する能力によっても、特徴付けられる。
【００３０】
幹細胞は、発生上の能力によって、（１）全ての胚性又は胚体外細胞のタイプを生ずる能力を有することを意味する、分化全能性、（２）全ての胚性細胞のタイプを生ずる能力を有することを意味する、分化万能性、（３）細胞系のサブセットを生ずる能力を有するが、それらが全て特定の組織、臓器、又は生理学的システムのものであるような、分化多能性（例えば、造血幹細胞（ＨＳＣ）は、ＨＳＣ（自己再生性）、血球限定的寡能性前駆細胞、及び、血液の通常の成分である全ての細胞種及び要素（例えば、血小板）を生じうる）、（４）多能性幹細胞よりも限定された細胞系のサブセットを生ずる能力を有することを意味する、分化寡能性、及び（５）単一の細胞系（例えば、精原幹細胞）を生ずる能力を有することを意味する、分化単一性に分類される。
【００３１】

分化は、非特殊化の（「中立の」）又は比較的特殊化されていない細胞が、例えば、神経細胞又は筋細胞等の特殊化した細胞の特徴を獲得するプロセスである。分化した、又は分化を誘発された細胞は、細胞系内でより特殊化した（「傾倒した」）状況を呈している細胞である。分化プロセスに適用した際の用語「傾倒した」は、通常の環境下で特定の細胞型又は細胞型の小集合に分化し続ける分化経路の地点に進行しており、通常の環境下で異なる細胞型に分化し、又はより分化されていない細胞型に戻ることができない細胞を指す。脱分化は、細胞が細胞系内で比較的特殊化されて（又は傾倒して）いない状況に戻るプロセスを指す。本明細書で使用するとき、細胞系は、細胞の遺伝、即ちその細胞がどの細胞から来たか、またどの細胞を生じ得るかを規定する。細胞系は、細胞を発達及び分化の遺伝的スキーム内に配置する。系特異的なマーカーは、対象とする系の細胞の表現型に特異的に関連した特徴を指し、中立細胞の対象とする系への分化を評価する際に使用することができる。

【００３２】

「β－細胞系」は、転写因子ＰＤＸ－１、及び以下の転写因子、すなわち、ＮＧＮ３、ＮＫＸ２．２、ＮＫＸ６．１、ＮＥＵＲＯＤ、ＩＳＬ１、ＨＮＦ－３β、ＭＡＦＡ、ＰＡＸ４、又はＰＡＸ６の少なくとも１つについて遺伝子の発現が陽性である細胞を指す。β細胞系に特徴的なマーカーを発現している細胞は、β細胞を含む。

【００３３】

本明細書で使用するとき、「胚体内胚葉系に特徴的なマーカーを発現している細胞」、又は「ステージ１細胞」、又は「ステージ１」とは、以下のマーカー、すなわち、ＳＯＸ１７、ＧＡＴＡ４、ＨＮＦ－３β、ＧＳＣ、ＣＥＲ１、Ｎｏｄａｌ、ＦＧＦ８、Ｂｒａｃｈｙｕｒｙ、Ｍｉｘ様ホメオボックスタンパク質、ＦＧＦ４　ＣＤ４８、ｅｏｍｅｓｏｄｅｒｍｉｎ（ＥＯＭＥＳ）、ＤＫＫ４、ＦＧＦ１７、ＧＡＴＡ６、ＣＸＣＲ４、Ｃ－Ｋｉｔ、ＣＤ９９又はＯＴＸ２のうちの少なくとも１つを発現している細胞を指す。胚体内胚葉系に特徴的なマーカーを発現している細胞は、原始線条前駆体細胞、原始線条細胞、中内胚葉細胞及び胚体内胚葉細胞を含む。

【００３４】

本明細書で使用するとき、「膵臓内胚葉系に特徴的なマーカーを発現している細胞」とは、以下のマーカー、すなわち、ＰＤＸ１、ＨＮＦ－１β、ＰＴＦ１α、ＨＮＦ６、又はＨＢ９のうちの少なくとも１つを発現している細胞を指す。膵臓内胚葉系に特徴的なマーカーを発現している細胞としては、膵臓内胚葉細胞、原腸管細胞、後部前腸細胞が挙げられる。

【００３５】

本明細書で使用するとき、「膵内分泌系に特徴的なマーカーを発現している細胞」、又は「ステージ５細胞」、又は「ステージ５」とは、以下のマーカー、すなわち、ＮＧＮ３、ＮＥＵＲＯＤ、ＩＳＬ１、ＰＤＸ１、ＮＫＸ６．１、ＰＡＸ４又はＰＴＦ－１αのうちの少なくとも１つを発現している細胞を指す。膵内分泌系に特徴的なマーカーを発現している細胞としては、膵内分泌細胞、膵臓ホルモン発現細胞及び膵臓ホルモン分泌細胞、並びにβ細胞系の細胞が挙げられる。

【００３６】

本明細書で使用するとき、「胚体内胚葉」は、原腸形成中、胚盤葉上層から生じ、胃腸管及びその誘導体を形成する細胞の特徴を保持する細胞を指す。胚体内胚葉細胞は、以下のマーカー、すなわち、ＨＮＦ－３β、ＧＡＴＡ４、ＳＯＸ－１７、Ｃｅｒｂｅｒｕｓ、ＯＴＸ２、グースコイド、Ｃ－Ｋｉｔ、ＣＤ９９、及びＭＩＸＬ１を発現する。

【００３７】

本明細書で使用するとき、「胚体外内胚葉」は、以下のマーカー、すなわち、ＳＯＸ７、ＡＦＰ、又はＳＰＡＲＣのうちの少なくとも１つを発現する細胞の集団を指す。

【００３８】

本明細書で使用するとき、「マーカー」とは、対象とする細胞で差異的に発現される核酸又はポリペプチド分子である。本文脈において、差異的な発現は、陽性マーカーのレベ

ルの増大及び陰性マーカーのレベルの減少を意味する。検出可能なレベルのマーカー核酸又はポリペプチドは、他の細胞と比較して対象とする細胞内で十分高く又は低く、そのため当該技術分野において既知の多様な方法のいずれかを使用して、対象とする細胞を他の細胞から識別及び区別することができる。

【００３９】

本明細書で使用するとき、「中内胚葉細胞」は、以下のマーカー、すなわち、ＣＤ４８、ｅｏｍｅｓｏｄｅｒｍｉｎ（ＥＯＭＥＳ）、ＳＯＸ１７、ＤＫＫ４、ＨＮＦ－３β、ＧＳＣ、ＦＧＦ１７、又はＧＡＴＡ－６のうちの少なくとも１つを発現している細胞を指す。

【００４０】

本明細書で使用するとき、「膵内分泌細胞」又は「膵臓ホルモン発現細胞」とは、以下のホルモン、すなわち、インスリン、グルカゴン、ソマトスタチン、及び膵臓ポリペプチドのうちの少なくとも１つを発現することが可能な細胞を指す。

【００４１】

本明細書で使用するとき、「膵臓内胚葉細胞」、又は「ステージ４細胞」、又は「ステージ４」とは、以下のマーカー、すなわち、ＮＧＮ３、ＮＥＵＲＯＤ、ＩＳＬ１、ＰＤＸ１、ＰＡＸ４又はＮＫＸ２．２のうちの少なくとも１つを発現することが可能な細胞を指す。

【００４２】

本明細書で使用するとき、「膵臓ホルモン産生細胞」とは、以下のホルモン、すなわち、インスリン、グルカゴン、ソマトスタチン、及び膵臓ポリペプチドのうちの少なくとも１つを産生することが可能な細胞を指す。

【００４３】

本明細書で使用するとき、「膵臓ホルモン分泌細胞」とは、以下のホルモン、すなわち、インスリン、グルカゴン、ソマトスタチン、及び膵臓ポリペプチドのうちの少なくとも１つを分泌することが可能な細胞を指す。

【００４４】

本明細書で使用するとき、「前腸後部細胞」、又は「ステージ３細胞」、又は「ステージ３」とは、以下のマーカー、すなわち、ＰＤＸ１、ＨＮＦ１、ＰＴＦ－１α、ＨＮＦ６、ＨＢ－９、又はＰＲＯＸ－１のうちの少なくとも１つを分泌すことが可能な細胞を指す。

【００４５】

本明細書で使用するとき、「前原始線条細胞」とは、以下のマーカー、すなわち、ノーダル（Nodal）、又はＦＧＦ８のうちの少なくとも１つを発現する細胞を指す。

【００４６】

本明細書で使用するとき、「原始腸管細胞」、又は「ステージ２細胞」、又は「ステージ２」とは、以下のマーカー、すなわち、ＨＮＦ－１、ＨＮＦ－４αのうちの少なくとも１つを分泌することが可能な細胞を指す。

【００４７】

本明細書で使用するとき、「原始線条細胞」とは、以下のマーカー、すなわち、Ｂｒａｃｈｉｕｒｙ、Ｍｉｘ様ホメオボックスタンパク質、又はＦＧＦ４のうちの少なくとも１つを発現する細胞を指す。

【００４８】

多能性幹細胞の単離、増殖及び培養

多能性幹細胞の特徴付け

多能性幹細胞の多能性は、例えば細胞を重症複合型免疫不全症（ＳＣＩＤ）マウスに注入し、形成された奇形腫を４％パラホルムアルデヒドを使用して固定した後、それらを３つの胚葉からの細胞型の痕跡に関して組織学的に検査することにより確認することができる。代替的に、多能性は、胚様体を形成させ、この胚様体を３つの胚葉に関連したマーカーの存在に関して評価することにより決定することができる。

【００４９】
　増殖した多能性幹細胞株は、標準的なＧバンド法を使用して核型を決定することができ、確立された対応する霊長類種の核型と比較される。「正常な核型」を有する細胞を獲得することが望ましく、これは細胞が正倍数体であることを意味し、全ヒト染色体が存在し、かつ、著しく変更されてはいない。
【００５０】
　多能性幹細胞の源
　使用が可能な多能性幹細胞の種類としては、妊娠期間中の任意の時期（必ずしもではないが、通常は妊娠約１０～１２週よりも前）に採取した前胚性組織（例えば胚盤胞など）、胚性組織又は胎児組織などの、妊娠後に形成される組織に由来する多能性細胞の樹立株が含まれる。非限定的な例は、例えばヒト胚性幹細胞株Ｈ１、Ｈ７及びＨ９（ＷｉＣｅｌｌ）などのヒト胚性幹細胞又はヒト胚生殖細胞の樹立株である。それらの細胞の最初の樹立又は安定化中に本開示の組成物を使用することも想定され、その場合、源となる細胞は、源となる組織から直接採取した一次多能性細胞であろう。フィーダー細胞の不在下で既に培養された多能性幹細胞集団から採取した細胞も好適である。例えば、ＢＧ０１ｖ（ＢｒｅｓａＧｅｎ，Ａｔｈｅｎｓ，ＧＡ）などの変異ヒト胚性幹細胞株も好適である。
【００５１】
　一実施形態では、ヒト胚性幹細胞は、Ｔｈｏｍｓｏｎら（米国特許第５，８４３，７８０号、Ｓｃｉｅｎｃｅ　２８２：１１４５、１９９８年、Ｃｕｒｒ．Ｔｏｐ．Ｄｅｖ．Ｂｉｏｌ．３８：１３３ｆｆ．、１９９８年、Ｐｒｏｃ．Ｎａｔｌ．Ａｃａｄ．Ｓｃｉ．Ｕ．Ｓ．Ａ．９２：７８４４、１９９５年）に記載されているように調製される。
【００５２】
　一実施形態では、多能性幹細胞はＴａｋａｈａｓｈｉら（Ｃｅｌｌ　１３１：１～１２，２００７）により記載されているように調製する。
【００５３】
　多能性幹細胞の培養
　一実施形態では、多能性幹細胞は、一般にフィーダー細胞の層上で培養され、このフィーダー細胞は、多能性幹細胞を様々な方法で支持する。あるいは多能性幹細胞は、基本的にフィーダー細胞を含まないにもかかわらず多能性幹細胞の増殖を支持する培養系において、実質的に分化することなく培養される。フィーダー細胞不含培養における多能性幹細胞の分化を伴わない増殖は、あらかじめ他の細胞種を培養することにより条件づけした培地を使用して支持される。あるいはフィーダー細胞不含培養における多能性幹細胞の分化を伴わない増殖は、合成培地を使用して支持される。
【００５４】
　多能性幹細胞は、好適な培養基質上に播くことができる。一実施形態では、好適な培養基質は、例えば基底膜から誘導されたもの、又は接着分子受容体－リガンド結合の一部を形成し得るもの等の細胞外マトリックス成分である。一実施形態では、好適な培養基質は、ＭＡＴＲＩＧＥＬ（登録商標）（Ｂｅｃｔｏｎ　Ｄｉｃｋｅｎｓｏｎ）である。ＭＡＴＲＩＧＥＬ（登録商標）は、Ｅｎｇｅｌｂｒｅｔｈ－Ｈｏｌｍ－Ｓｗａｒｍ腫瘍細胞からの可溶性製剤であり、室温でゲル化して再構成基底膜を形成する。
【００５５】
　他の細胞外マトリックス成分及び成分混合物は代替物として好適である。増殖させる細胞型に応じて、これは、ラミニン、フィブロネクチン、プロテオグリカン、エンタクチン、ヘパラン硫塩、及び同様物を、単独で又は様々な組み合わせで含み得る。
【００５６】
　多能性幹細胞は、細胞の生存、増殖、及び所望の特徴の維持を促進する培地の存在下、基質上に好適な分布にて播かれてもよい。これら全特徴は、播種分布に細心の注意を払うことから利益を得、当業者は容易に決定することができる。
【００５７】
　好適な培地は以下の構成要素、例えば、ダルベッコ変法イーグル培地（ＤＭＥＭ）、Ｇ

ｉｂｃｏ＃１１９６５－０９２、ノックアウトダルベッコ変法イーグル培地（ＫＯ　ＤＭＥＭ）、Ｇｉｂｃｏ　＃　１０８２９－０１８、Ｈａｍ’ｓ　Ｆ１２／５０％　ＤＭＥＭ基本培地、２００ｍＭのＬ－グルタミン、Ｇｉｂｃｏ　＃　１５０３９－０２７、非必須アミノ酸溶液、Ｇｉｂｃｏ　１１１４０－０５０、β－メルカプトエタノール、Ｓｉｇｍａ　＃　Ｍ７５２２、ヒト組み換え塩基性線維芽細胞増殖因子（ｂＦＧＦ）、Ｇｉｂｃｏ　＃　１３２５６－０２９から作製されてもよい。

【００５８】

多能性幹細胞からの膵臓ホルモン産生細胞の形成

一実施形態では、本発明は、多能性幹細胞から膵臓ホルモン産生細胞を作製するための方法を提供し、かかる方法は、

ａ．多能性幹細胞を培養する工程と、

ｂ．多能性幹細胞を、胚体内胚葉系に特徴的なマーカーを発現している細胞に分化させる工程と、

ｃ．胚体内胚葉系に特徴的なマーカーを発現している細胞を、膵臓内胚葉系に特徴的なマーカーを発現している細胞に分化させる工程と、

ｄ．膵臓内胚葉系に特徴的なマーカーを発現している細胞を、膵内分泌系に特徴的なマーカーを発現している細胞に分化させる工程と、を含む。

【００５９】

本発明の一態様では、膵内分泌細胞は、膵臓ホルモン産生細胞である。別の態様では、膵内分泌細胞は、β細胞系に特徴的なマーカーを発現する細胞である。β細胞系に特徴的なマーカーを発現している細胞は、ＰＤＸ１と、以下の転写因子、すなわち、ＮＧＮ３、ＮＫＸ２．２、ＮＫＸ６．１、ＮＥＵＲＯＤ、ＩＳＬ１、ＨＮＦ－３β、ＭＡＦＡ、ＰＡＸ４、又はＰＡｘ６のうちの少なくとも１つを発現する。本発明の一態様では、β細胞系に特徴的なマーカーを発現している細胞は、β細胞である。

【００６０】

本発明での使用に好適な多能性幹細胞としては、例えばヒト胚性幹細胞株Ｈ９（ＮＩＨ　ｃｏｄｅ：ＷＡ０９）、ヒト胚性幹細胞株Ｈ１（ＮＩＨ　ｃｏｄｅ：ＷＡ０１）、ヒト胚性幹細胞株Ｈ７（ＮＩＨ　ｃｏｄｅ：ＷＡ０７）、及びヒト胚性幹細胞株ＳＡ００２（Ｃｅｌｌａｒｔｉｓ，Ｓｗｅｄｅｎ）が挙げられる。多能性細胞に特徴的な以下のマーカー、すなわち、ＡＢＣＧ２、ｃｒｉｐｔｏ、ＣＤ９、ＦＯＸＤ３、コネキシン４３、コネキシン４５、ＯＣＴ４、ＳＯＸ２、Ｎａｎｏｇ、ｈＴＥＲＴ、ＵＴＦ－１、ＺＦＰ４２、ＳＳＥＡ－３、ＳＳＥＡ－４、Ｔｒａ１－６０又はＴｒａ１－８１のうちの少なくとも１つを発現する細胞も本発明での使用に適している。

【００６１】

多能性幹細胞は、フィーダー細胞層上で培養することもできる。別の方法としては、多能性幹細胞は細胞外マトリックス上で培養することもできる。細胞外マトリックスは、マウス肉腫細胞から抽出された可溶化基底膜製剤（商品名ＭＡＴＲＩＧＥＬ（商標）でＢＤ　Ｂｉｏｓｃｉｅｎｃｅｓから販売されている）であってもよい。あるいは細胞外マトリックスは、ｇｒｏｗｔｈ　ｆａｃｔｏｒ－ｒｅｄｕｃｅｄ　ＭＡＴＲＩＧＥＬ（商標）であってもよい。あるいは細胞外マトリックスは、フィブロネクチンであってもよい。別の実施形態では、多能性幹細胞は、ヒト血清で被覆された組織培養基質上で培養され及び分化する。

【００６２】

細胞外マトリックスは、組織培養基質で被覆される前に希釈されてもよい。細胞外マトリックスの希釈と、組織培養基質の被覆に関する好適な方法の例は、Ｋｌｅｉｎｍａｎ，Ｈ．Ｋ．ら、Ｂｉｏｃｈｅｍｉｓｔｒｙ　２５：３１２（１９８６年）、及びＨａｄｌｅｙ，Ｍ．Ａ．ら、Ｊ．Ｃｅｌｌ．Ｂｉｏｌ．１０１：１５１１（１９８５年）に見出すことができる。

【００６３】

一実施形態では、細胞外マトリックスは、ＭＡＴＲＩＧＥＬ（商標）である。一実施形

態では、組織培養基質は、１：１０希釈のＭＡＴＲＩＧＥＬ（商標）でコートする。別の実施形態では、組織培養基質は、１：１５希釈のＭＡＴＲＩＧＥＬ（商標）でコートする。別の実施形態では、組織培養基質は、１：３０希釈のＭＡＴＲＩＧＥＬ（商標）でコートする。別の実施形態では、組織培養基質は、１：６０希釈のＭＡＴＲＩＧＥＬ（商標）でコートする。

【００６４】

一実施形態では、組織培養基質は、ｇｒｏｗｔｈ　ｆａｃｔｏｒ－ｒｅｄｕｃｅｄ　ＭＡＴＲＩＧＥＬ（商標）である。一実施形態では、組織培養基質は、１：１０希釈のｇｒｏｗｔｈ　ｆａｃｔｏｒ－ｒｅｄｕｃｅｄ　ＭＡＴＲＩＧＥＬ（商標）でコートする。別の実施形態では、組織培養基質は、１：１５希釈のｇｒｏｗｔｈ　ｆａｃｔｏｒ－ｒｅｄｕｃｅｄ　ＭＡＴＲＩＧＥＬ（商標）でコートする。別の実施形態では、組織培養基質は、１：３０希釈のｇｒｏｗｔｈ　ｆａｃｔｏｒ－ｒｅｄｕｃｅｄ　ＭＡＴＲＩＧＥＬ（商標）でコートする。別の実施形態では、組織培養基質は、１：６０希釈のｇｒｏｗｔｈ　ｆａｃｔｏｒ－ｒｅｄｕｃｅｄ　ＭＡＴＲＩＧＥＬ（商標）でコートする。

【００６５】

胚体内胚葉系に特徴的なマーカーは、ＳＯＸ１７、ＧＡＴＡ４、ＨＮＦ－３β、ＧＳＣ、ＣＥＲ１、Ｎｏｄａｌ、ＦＧＦ８、短尾奇形、Ｍｉｘ－様ホメオボックスタンパク質、ＦＧＦ４　ＣＤ４８、ｅｏｍｅｓｏｄｅｒｍｉｎ（ＥＯＭＥＳ）、ＤＫＫ４、ＦＧＦ１７、ＧＡＴＡ６、ＣＸＣＲ４、Ｃ－Ｋｉｔ、ＣＤ９９、及びＯＴＸ２からなる群より選択される。本発明での使用に好適なものは、胚体内胚葉系に特徴的なマーカーのうちの少なくとも１つを発現している細胞である。本発明の一態様において、胚体内胚葉系に特徴的なマーカーを発現している細胞は、原始線条前駆体細胞である。別の態様において、胚体内胚葉系に特徴的なマーカーを発現している細胞は、中内胚葉細胞である。別の態様において、胚体内胚葉系に特徴的なマーカーを発現している細胞は、胚体内胚葉細胞である。

【００６６】

膵臓内胚葉系に特徴的なマーカーは、ＰＤＸ１、ＨＮＦ－１β、ＰＴＦ１α、ＨＮＦ６、ＨＢ９及びＰＲＯＸ１からなる群から選択される。本発明での使用に好適なものは、膵臓内胚葉系の特徴を示す少なくとも１つのマーカーを発現している細胞である。本発明の一態様において、膵臓内胚葉系に特徴的なマーカーを発現している細胞は、膵臓内胚葉細胞である。

【００６７】

膵内分泌系に特徴的なマーカーは、ＮＧＮ３、ＮＥＵＲＯＤ、ＩＳＬ１、ＰＤＸ１、ＮＫＸ６．１、ＰＡＸ４、及びＰＴＦ－１αからなる群から選択される。一実施形態では、膵内分泌細胞は、以下のホルモンの少なくとも１つを発現することができる：インスリン、グルカゴン、ソマトスタチン、及び膵臓ポリペプチド。本発明で使用するのに好適なものは、膵内分泌系の特徴を示すマーカーを少なくとも１つ発現する細胞である。本発明の一態様において、膵内分泌系に特徴的なマーカーを発現している細胞は、膵内分泌細胞である。膵内分泌細胞は、膵臓ホルモン発現細胞であってもよい。代替的に、膵内分泌細胞は、膵臓ホルモン分泌細胞であってもよい。

【００６８】

胚体内胚葉系に特徴的なマーカーを発現している細胞の形成

本発明の一態様では、胚体内胚葉系に特徴的なマーカーを発現している細胞へと多能性幹細胞を分化させるのに十分な量のＧＤＦ－８を含有する培地中で多能性幹細胞を培養することで、胚体内胚葉系に特徴的なマーカーを発現している細胞へと多能性幹細胞が分化し得る。

【００６９】

約１日～約７日間にわたって十分な量のＧＤＦ－８を含有する培地で多能性幹細胞を培養してもよい。あるいは、約１日～約６日間にわたって十分な量のＧＤＦ－８を含有する培地で多能性幹細胞を培養してもよい。あるいは、約１日～約５日間にわたって十分な量のＧＤＦ－８を含有する培地で多能性幹細胞を培養してもよい。あるいは、約１日～約４

日間にわたって十分な量のＧＤＦ－８を含有する培地で多能性幹細胞を培養してもよい。あるいは、約１日～約３日間にわたって十分な量のＧＤＦ－８を含有する培地で多能性幹細胞を培養してもよい。あるいは、約１日～約２日間にわたって十分な量のＧＤＦ－８を含有する培地で多能性幹細胞を培養してもよい。あるいは、約１日間にわたって十分な量のＧＤＦ－８を含有する培地で多能性幹細胞を培養してもよい。

【００７０】

一実施形態では、ＧＤＦ－８は約５ｎｇ／ｍＬ～約５００ｎｇ／ｍＬの濃度で使用される。別の実施形態では、ＧＤＦ－８は約５ｎｇ／ｍＬ～約５０ｎｇ／ｍＬの濃度で使用される。別の実施形態では、ＧＤＦ－８は約５ｎｇ／ｍＬ～約２５ｎｇ／ｍＬの濃度で使用される。別の実施形態では、ＧＤＦ－８は約２５ｎｇ／ｍＬの濃度で使用される。

【００７１】

一実施形態では、十分な量のＧＤＦ－８を含有する培地はまた、少なくとも１つの他の因子を含有する。一実施形態では、少なくとも１つの他の因子は、ＥＧＦ、ＦＧＦ４、ＰＤＧＦ－Ａ、ＰＤＧＦ－Ｂ、ＰＤＧＦ－Ｃ、ＰＤＧＦ－Ｄ、ＶＥＧＦ、ムシモール、ＰＤ９８０５９、ＬＹ２９４００２、Ｕ０１２４、Ｕ０１２６、及び酪酸ナトリウムからなる群から選択される。

【００７２】

一実施形態では、ＥＧＦは約５ｎｇ／ｍＬ～約５００ｎｇ／ｍＬの濃度で使用される。別の実施形態では、ＥＧＦは約５ｎｇ／ｍＬ～約５０ｎｇ／ｍＬの濃度で使用される。別の実施形態では、ＥＧＦは約５０ｎｇ／ｍＬの濃度で使用される。

【００７３】

一実施形態では、ＦＧＦ４は約５ｎｇ／ｍＬ～約５００ｎｇ／ｍＬの濃度で使用される。別の実施形態では、ＦＧＦ４は約５ｎｇ／ｍＬ～約５０ｎｇ／ｍＬの濃度で使用される。別の実施形態では、ＦＧＦ４は約５０ｎｇ／ｍＬの濃度で使用される。

【００７４】

一実施形態では、ＰＤＧＦ－Ａは約５ｎｇ／ｍＬ～約５００ｎｇ／ｍＬの濃度で使用される。別の実施形態では、ＰＤＧＦ－Ａは約５ｎｇ／ｍＬ～約５０ｎｇ／ｍＬの濃度で使用される。別の実施形態では、ＰＤＧＦ－Ａは約５０ｎｇ／ｍＬの濃度で使用される。

【００７５】

一実施形態では、ＰＤＧＦ－Ｂは約５ｎｇ／ｍＬ～約５００ｎｇ／ｍＬの濃度で使用される。別の実施形態では、ＰＤＧＦ－Ｂは約５ｎｇ／ｍＬ～約５０ｎｇ／ｍＬの濃度で使用される。別の実施形態では、ＰＤＧＦ－Ｂは約５０ｎｇ／ｍＬの濃度で使用される。

【００７６】

一実施形態では、ＰＤＧＦ－Ｃは約５ｎｇ／ｍＬ～約５００ｎｇ／ｍＬの濃度で使用される。別の実施形態では、ＰＤＧＦ－Ｃは約５ｎｇ／ｍＬ～約５０ｎｇ／ｍＬの濃度で使用される。別の実施形態では、ＰＤＧＦ－Ｃは約５０ｎｇ／ｍＬの濃度で使用される。

【００７７】

一実施形態では、ＰＤＧＦ－Ｄは約５ｎｇ／ｍＬ～約５００ｎｇ／ｍＬの濃度で使用される。別の実施形態では、ＰＤＧＦ－Ｄは約５ｎｇ／ｍＬ～約５０ｎｇ／ｍＬの濃度で使用される。別の実施形態では、ＰＤＧＦ－Ｄは約５０ｎｇ／ｍＬの濃度で使用される。

【００７８】

一実施形態では、ＶＥＧＦは約５ｎｇ／ｍＬ～約５００ｎｇ／ｍＬの濃度で使用される。別の実施形態では、ＶＥＧＦは約５ｎｇ／ｍＬ～約５０ｎｇ／ｍＬの濃度で使用される。別の実施形態では、ＶＥＧＦは約５０ｎｇ／ｍＬの濃度で使用される。

【００７９】

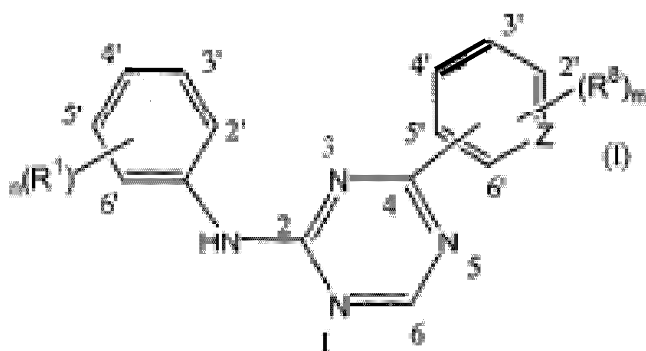
一実施形態では、ムシモールは約１μＭ～約２００μＭの濃度で使用される。別の実施形態では、ムシモールは約１μＭ～約２０μＭの濃度で使用される。別の実施形態では、ムシモールは約２０μＭの濃度で使用される。

【００８０】

一実施形態では、ＰＤ９８０５９は約０．１μＭ～約１０μＭの濃度で使用される。別

の実施形態では、ＰＤ９８０５９は約０．１μＭ～約１μＭの濃度で使用される。別の実施形態では、ＰＤ９８０５９は約１μＭの濃度で使用される。
【００８１】
一実施形態では、ＬＹ２９４００２は約０．２５μＭ～約２５μＭの濃度で使用される。別の実施形態では、ＬＹ２９４００２は約０．２５μＭ～約２．５μＭの濃度で使用される。別の実施形態では、ＬＹ２９４００２は約２．５μＭの濃度で使用される。
【００８２】
一実施形態では、Ｕ０１２４は約０．１μＭ～約１０μＭの濃度で使用される。別の実施形態では、Ｕ０１２４は約０．１μＭ～約１μＭの濃度で使用される。別の実施形態では、Ｕ０１２４は約１μＭの濃度で使用される。
【００８３】
一実施形態では、Ｕ０１２６は約０．１μＭ～約１０μＭの濃度で使用される。別の実施形態では、Ｕ０１２６は約０．１μＭ～約１μＭの濃度で使用される。別の実施形態では、Ｕ０１２６は約１μＭの濃度で使用される。
【００８４】
一実施形態では、酪酸ナトリウムは約０．０５μＭ～約５μＭの濃度で使用される。一実施形態では、酪酸ナトリウムは約０．０５μＭ～約０．５μＭの濃度で使用される。一実施形態では、酪酸ナトリウムは約０．５μＭの濃度で使用される。
【００８５】
別の実施形態では、少なくとも１つの他の因子は：アニリン－ピリジノトリアジン、環式アニリン－ピリジノトリアジン、Ｎ－｛［１－（フェニルメチル）アゼパン－４－イル］メチル｝－２－ピリジン－３－イルアセトアミド、４－｛［４－（４－｛［２－（ピリジン－２－イルアミノ）エチル］アミノ｝－１，３，５－トリアジン－２－イル）ピリジン－２－イル］オキシ｝ブタン－１－オール、３－（｛３－［４－（｛２－［メチル（ピリジン－２－イル）アミノ］エチル｝アミノ）－１，３，５－トリアジン－２－イル］ピリジン－２－イル｝アミノ）プロパン－１－オール、Ｎ～４～－［２－（３－フルオロフェニル）エチル］－Ｎ～２～－［３－（４－メチルピペラジン－１－イル）プロピル］ピリド［２，３－ｄ］ピリミジン－２，４－ジアミン、１－メチル－Ｎ－［（４－ピリジン－３－イル－２－｛［３－（トリフルオロメチル）フェニル］アミノ｝－１，３－チアゾール－５－イル）メチル］ピペリジン－４－カルボキサミド、１，１－ジメチルエチル｛２－［４－（｛５－［３－（３－ヒドロキシプロピル）フェニル］－４Ｈ－１，２，４－トリアゾール－３－イル｝アミノ）フェニル］エチル｝カルバメート、１，１－ジメチルエチル｛［３－（｛５－［５－（３－ヒドロキシプロピル）－２－（メチルオキシ）フェニル］－１，３－オキサゾール－２－イル｝アミノ）フェニル］メチル｝カルバメート、１－（｛５－［６－（｛４－［（４－メチルピペラジン－１－イル）スルホニル］フェニル｝アミノ）ピラジン－２－イル］チオフェン－２－イル｝メチル）ピペリジン－４－オール、１－（｛４－［６－（｛４－［（４－メチルピペラジン－１－イル）スルホニル］フェニル｝アミノ）ピラジン－２－イル］チオフェン－２－イル｝メチル）ピペリジン－４－カルボキサミド、及び２－｛［４－（１－メチルエチル）フェニル］アミノ｝－Ｎ－（２－チオフェン－２－イルエチル）－７，８－ジヒドロピリド［４，３－ｄ］ピリミジン－６（５Ｈ）－カルボキサミドからなる群から選択される。
【００８６】
本発明の化合物
本発明は、胚体内胚葉系に特徴的なマーカーを発現している細胞へと多能性幹細胞を分化させ得る化合物を提供する。
【００８７】
一実施形態では、胚体内胚葉系に特徴的なマーカーを発現している細胞へと多能性幹細胞を分化させ得る化合物は、式（１）のアニリン－ピリジノトリアジンである。
【００８８】

【化１】



式（１）

【００８９】

Ｎ－酸化物形態、製薬上許容できる追加の塩及びそれらを形成する立体異性体では、

式中、ｍは１～４の整数を表し；ｎは１～４の整数を表し；ＺはＮ又はＣを表し；

$Ｒ^{1}$及び$Ｒ^{8}$はそれぞれ独立して水素、$Ｈｅｔ^{14}$、シアノ、ハロ、ヒドロキシ、$Ｃ_{1～6}$アルコキシー、$Ｃ_{1～6}$アルキルー、モノー若しくはジ（$Ｃ_{1～4}$アルキル）アミノーカルボニルー、モノー若しくはジ（$Ｃ_{1～4}$アルキル）アミノースルホニル、ハロで置換された$Ｃ_{1～6}$アルコキシを表し、あるいは$Ｒ^{1}$はヒドロキシ若しくはハロから選択される１つの置換基で置換されたか又は可能な場合には２つ以上の置換基で置換された$Ｃ_{1～6}$アルキルを表し；

$Ｒ^{2}$及び$Ｒ^{9}$はそれぞれ独立して水素、$Ｃ_{1～4}$アルキル、$Ｃ_{2～4}$アルケニル、$Ｈｅｔ^{3}$、$Ｈｅｔ^{4}$－$Ｃ_{1～4}$アルキルー、$Ｈｅｔ^{5}$－$Ｃ_{1～4}$アルキルカルボニルー、モノー若しくはジ（$Ｃ_{1～4}$アルキル）アミノ－$Ｃ_{1～4}$アルキルーカルボニルー、あるいは任意に水素、ヒドロキシ、アミノ若しくは$Ｃ_{1～4}$アルキルオキシから選択される１つの置換基で置換されたか又は可能な場合には２つ以上の置換基で置換されたフェニルを表し；

$Ｒ^{3}$及び$Ｒ^{7}$はそれぞれ独立して水素、$Ｃ_{1～4}$アルキル、$Ｈｅｔ^{6}$、$Ｈｅｔ^{7}$－$Ｃ_{1～4}$アルキルー、任意に$Ｈｅｔ^{8}$－$Ｃ_{1～4}$アルキルアミノカルボニルで置換された$Ｃ_{2～4}$アルケニルカルボニル、$Ｃ_{2～4}$アルケニルスルホニルー、$Ｃ_{1～4}$アルキルオキシ（lkyloxy）$Ｃ_{1～4}$アルキルー、あるいは任意に水素、ヒドロキシ、アミノ若しくは$Ｃ_{1～4}$アルキルオキシから選択される１つの置換基で置換されたか又は可能な場合には２つ以上の置換基で置換されたフェニルを表し；

Ｒ４、Ｒ５、Ｒ６及び$Ｒ^{10}$はそれぞれ独立して水素を表すか又は任意にヒドロキシ、$Ｈｅｔ^{9}$若しくは$Ｃ_{1～4}$アルキルオキシで置換された$Ｃ_{1～4}$アルキルを表し；

$Ｈｅｔ^{1}$及び$Ｈｅｔ^{2}$はそれぞれ独立してピロリジニル、ピペリジニル、ピペラジニル、ピリジニル、ピリミジニル、ピラジニル、イミダゾリジニル又はピラゾリジニルから選択される複素環を表し、ここでかかる$Ｈｅｔ^{1}$及び$Ｈｅｔ^{2}$は任意にアミノ、ヒドロキシ、$Ｃ_{1～4}$アルキル、ヒドロキシー$Ｃ_{1～4}$アルキル（alIcyl）ー、フェニル、フェニルー$Ｃ_{1～4}$アルキルー、$Ｃ_{1～4}$アルキルーオキシー$Ｃ_{1～4}$アルキルーモノー若しくはジ（$Ｃ_{1～4}$アルキル）アミノー若しくはアミノーカルボニルーで置換され；

$Ｈｅｔ^{3}$及び$Ｈｅｔ^{6}$はそれぞれ独立してピロリジニル又はピペリジニルから選択される複素環を表し、ここでかかる$Ｈｅｔ^{3}$及び$Ｈｅｔ^{6}$は任意に$Ｃ_{1～4}$アルキル、$Ｃ_{3～6}$シクロアルキル、ヒドロキシー$Ｃ_{1～4}$アルキルー、$Ｃ_{1～4}$アルキルオキシ$Ｃ_{1～4}$アルキル又はポリヒドロキシー$Ｃ_{1～4}$アルキルーから選択される１つの置換基で置換されるか又は可能な場合には２つ以上の置換基で置換され；

$Ｈｅｔ^{4}$、$Ｈｅｔ^{7}$及び$Ｈｅｔ^{9}$はそれぞれ独立してモルホリニル、ピロリジニル、ピペラジニル又はピペリジニルから選択される複素環を表し、ここでかかる$Ｈｅｔ^{4}$、$Ｈｅｔ^{7}$及び$Ｈｅｔ^{9}$は任意に$Ｃ_{1～4}$アルキル、$Ｃ_{3～6}$シクロアルキル、ヒドロキシー$Ｃ_{1～4}$アルキルー、$Ｃ_{1～4}$アルキルオキシ$Ｃ_{1～4}$アルキル又はポリヒドロキシー$Ｃ_{1～4}$アルキルーから選択される１つの置換基で置換されるか又は可能な場合には２つ以上の置換基で置換され；

Ｈｅｔ^{5}はモルホリニル、ピロリジニル、ピペラジニル又はピペリジニル（pipendinyl）から選択される複素環を表し、ここでかかるＨｅｔ^{5}は任意にＣ$_{1～4}$アルキル、Ｃ$_{3～6}$シクロアルキル、ヒドロキシ－Ｃ$_{1～4}$アルキル－、Ｃ$_{1～4}$アルキルオキシＣ$_{1～4}$アルキル又はポリヒドロキシ－Ｃ$_{1～4}$アルキル－から選択される１つの置換基で置換されるか又は可能な場合には２つ以上の置換基で置換され；

Ｈｅｔ^{10}、Ｈｅｔ^{11}及びＨｅｔ^{13}はそれぞれ独立してピロリジニル、ピペリジニル、ピペラジニル、ピリジニル、ピリミジニル、ピラジニル、イミダゾリジニル又はピラゾリジニルから選択される複素環を表し、ここでかかるＨｅｔ^{10}、Ｈｅｔ^{11}及びＨｅｔ^{13}は任意にアミノ、ヒドロキシ、Ｃ$_{1～4}$アルキル、ヒドロキシ－Ｃ$_{1～4}$アルキル－、フェニル、フェニル－Ｃ$_{1～4}$アルキル－、Ｃ$_{1～4}$アルキル－オキシ－Ｃ$_{1～4}$アルキル－、アミノ－カルボニル－又はモノ－若しくはジ（Ｃ$_{1～4}$アルキル）アミノ－で置換され；

Ｈｅｔ^{12}はピロリジニル、ピペリジニル、ピペラジニル、ピリジニル、ピリミジニル、ピラジニル、イミダゾリジニル又はピラゾリジニルから選択された複素環を表し、ここでかかるＨｅｔ^{12}は任意にアミノ、ヒドロキシ、Ｃ$_{1～4}$アルキル、ヒドロキシ－Ｃ$_{1～4}$アルキル－、フェニル、フェニル－Ｃ$_{1～4}$アルキル－、Ｃ$_{1～4}$アルキル－オキシ－Ｃ$_{1～4}$アルキル－；モノ－若しくはジ（Ｃ$_{1～4}$アルキル）アミノ－若しくはアミノ－カルボニル－で置換され；

Ｈｅｔ^{14}はモルホリニル；ピロリジニル；ピペラジニル；イミダゾリル；ピロリル；２，３，４－トリアザピロリル；１，２，３－トリアゾリル；ピラゾリル；又はピペリジニルから選択される複素環を表し、ここでかかるＨｅｔ^{14}は任意にＣ$_{1～4}$アルキル、Ｃ$_{3～6}$シクロアルキル、ヒドロキシ－Ｃ$_{1～4}$アルキル－、Ｃ$_{1～4}$アルキルオキシＣ$_{1～4}$アルキル又はポリヒドロキシ－Ｃ$_{1～4}$アルキル－から選択される１つの置換基で置換されるか又は可能な場合には２つ以上の置換基で置換され；具体的にはＨｅｔ^{14}はモルホリニル；ピロリジニル；ピロリル；２，３，４－トリアザピロリル；ピペラジニル又はピペリジニルから選択される複素環を表し、ここでかかるＨｅｔ^{14}は任意にＣ$_{1～4}$アルキル、Ｃ$_{3～6}$シクロアルキル、ヒドロキシ－Ｃ$_{1～4}$アルキル－、Ｃ$_{1～4}$アルキルオキシＣ$_{1～4}$アルキル又はポリヒドロキシ－Ｃ$_{1～4}$アルキル－から選択される１つの置換基で置換されるか又は可能な場合には２つ以上の置換基で置換され；より具体的にはＨｅｔ^{14}はモルホリニル；ピロリジニル；ピペラジニル又はピペリジニルから選択される複素環を表し、ここでかかるＨｅｔ^{14}は任意にＣ$_{1～4}$アルキル、Ｃ$_{3～6}$シクロアルキル、ヒドロキシ－Ｃ$_{1～4}$アルキル－、Ｃ$_{1～4}$アルキルオキシＣ$_{1～4}$アルキル又はポリヒドロキシ－Ｃ$_{1～4}$アルキル-から選択される１つの置換基で置換されるか又は可能な場合には２つ以上の置換基で置換される。

【００９０】

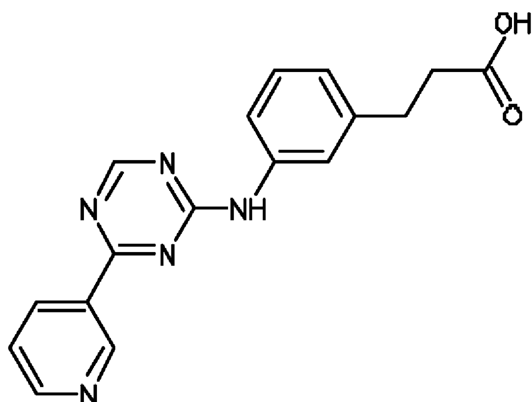
一実施形態では、アニリン－ピリジノトリアジンは式（１）の化合物である。

【００９１】

一実施形態では、アニリン－ピリジノトリアジンは式（２）の化合物である。

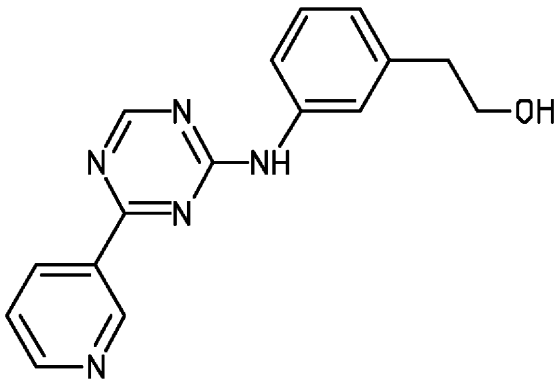
【００９２】

【化２】

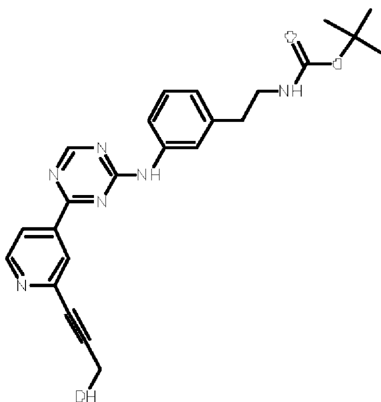


式（２）：３－｛３－［（４－ピリジン－３－イル－１，３，５－トリアジン－２－イ

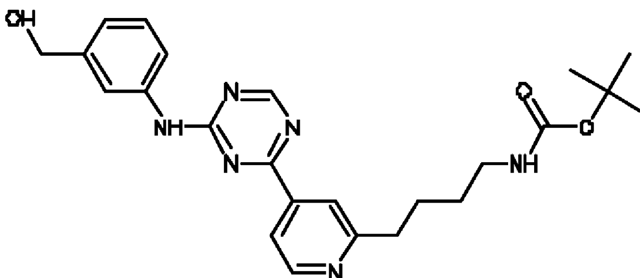
ル）アミノ］フェニル｝プロパン酸本明細書において「化合物１」として参照される。
【００９３】
一実施形態では、アニリン－ピリジノトリアジンは式（３）の化合物である。
【００９４】
【化３】



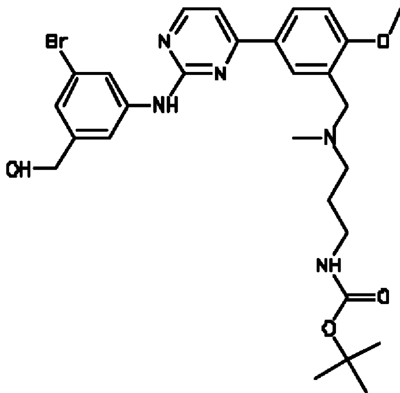
式（３）：２－｛３－［（４－ピリジン－３－イル－１，３，５－トリアジン－２－イル）アミノ］フェニル｝エタノール本明細書において「化合物２」として参照される。
【００９５】
一実施形態では、アニリン－ピリジノトリアジンは式（４）の化合物である。
【００９６】
【化４】

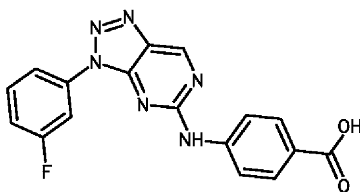


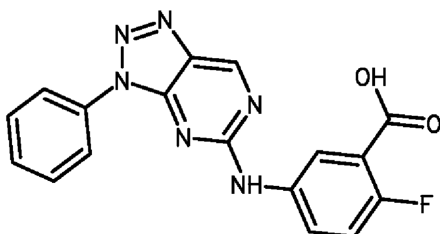
式（４）：１，１－ジメチルエチル｛２－［３－（｛４－［２－（３－ヒドロキシプロパ－１－イン－１－イル）ピリジン－４－イル］－１，３，５－トリアジン－２－イル｝アミノ）フェニル］エチル｝カルバメート本明細書において「化合物３」として参照される。
【００９７】
一実施形態では、アニリン－ピリジノトリアジンは式（５）の化合物である。
【００９８】
【化５】



式（５）：１，１－ジメチルエチル｛４－［４－（４－｛［３－（ヒドロキシメチル）フェニル］アミノ｝－１，３，５－トリアジン－２－イル）ピリジン－２－イル］ブチル

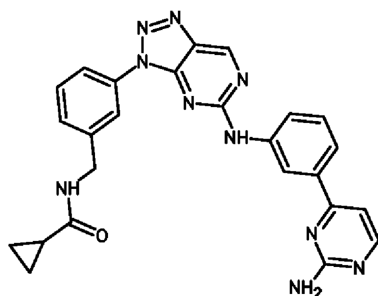
｝カルバメート本明細書において「化合物４」として参照される。
【００９９】
一実施形態では、アニリン－ピリジノトリアジンは式（６）の化合物である。
【０１００】
【化６】


式（６）：１，１－ジメチルエチル｛３－［｛［５－（２－｛［３－ブロモ－５－（ヒドロキシメチル）フェニル］アミノ｝ピリミジン－４－イル）－２－（メチルオキシ）フェニル］メチル｝（メチル）アミノ］プロピル｝カルバメート本明細書において「化合物５」として参照される。
【０１０１】
一実施形態では、アニリン－ピリジノトリアジンは式（７）の化合物である。
【０１０２】
【化７】


式（７）：４－｛［３－（３－フルオロフェニル）－３Ｈ－［１，２，３］トリアゾロ［４，５－ｄ］ピリミジン－５－イル］アミノ｝安息香酸本明細書において「化合物６」として参照される。
【０１０３】
一実施形態では、アニリン－ピリジノトリアジンは式（８）の化合物である。
【０１０４】
【化８】


式（８）：２－フルオロ－５－［（３－フェニル－３Ｈ－［１，２，３］トリアゾロ［４，５－ｄ］ピリミジン－５－イル）アミノ］安息香酸本明細書において「化合物７」として参照される。
【０１０５】
一実施形態では、アニリン－ピリジノトリアジンは式（９）の化合物である。
【０１０６】

【化９】



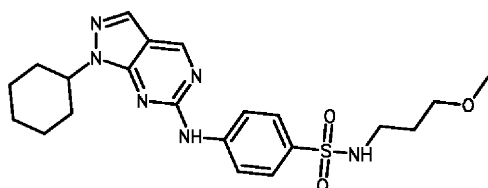
式（９）：Ｎ－｛［３－（５－｛［３－（２－アミノピリミジン－４－イル）フェニル］アミノ｝－３Ｈ－［１，２，３］トリアゾロ［４，５－ｄ］ピリミジン－３－イル）フェニル］メチル｝シクロプロパンカルボアミド本明細書において「化合物８」として参照される。

【０１０７】

一実施形態では、アニリン－ピリジノトリアジンは式（１０）の化合物である。

【０１０８】

【化１０】



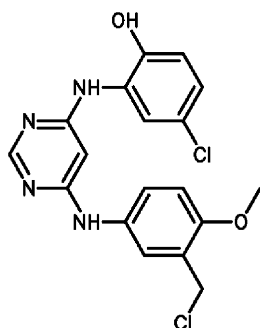
式（１０）：４－［（１－シクロヘキシル－１Ｈ－ピラゾロ［３，４－ｄ］ピリミジン－６－イル）アミノ］－Ｎ－［３－（メチルオキシ）プロピル］ベンゼンスルホンアミド本明細書において「化合物９」として参照される。

【０１０９】

一実施形態では、アニリン－ピリジノトリアジンは式（１１）の化合物である。

【０１１０】

【化１１】



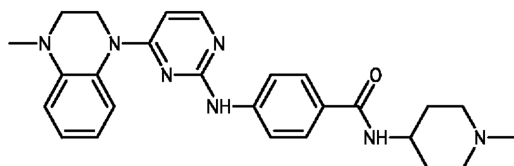
式（１１）：４－クロロ－２－［（６－｛［３－（クロロメチル）－４－メトキシフェニル］アミノ｝ピリミジン－４－イル）アミノ］フェノール本明細書において「化合物１０」として参照される。

【０１１１】

一実施形態では、アニリン－ピリジノトリアジンは式（１２）の化合物である。

【０１１２】

【化１２】



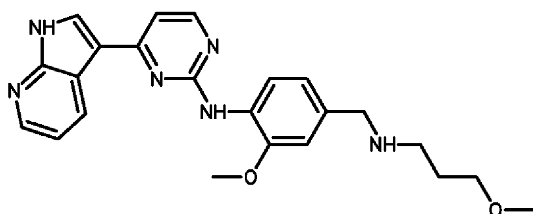
式（１２）：４－｛［４－（４－メチル－３，４－ジヒドロキノキサリン－１（２Ｈ）－イル）ピリミジン－２－イル］アミノ｝－Ｎ－（１－メチルピペリジン－４－イル）ベンズアミド本明細書において「化合物１１」として参照される。

【０１１３】

一実施形態では、アニリン－ピリジノトリアジンは式（１３）の化合物である。

【０１１４】

【化１３】



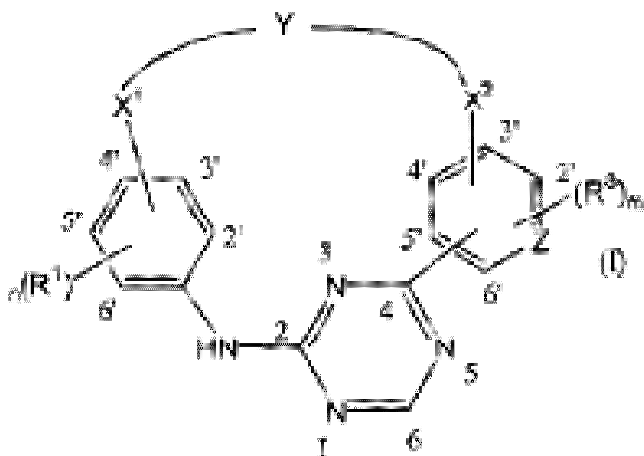
式（１３）：Ｎ－（２－メトキシ－４－｛［（３－メトキシプロピル）アミノ］メチル｝フェニル）－４－（１Ｈ－ピロロ［２，３－ｂ］ピリジン－３－イル）ピリミジン－２－アミン本明細書において「化合物１２」として参照される。

【０１１５】

一実施形態では、胚体内胚葉系に特徴的なマーカーを発現している細胞へと多能性幹細胞を分化させ得る化合物は、式（１４）の環式アニリン－ピリジノトリアジンである。

【０１１６】

【化１４】



式（１４）

【０１１７】

Ｎ－酸化物形態、製薬上許容できる追加の塩及びそれらの立体化学異性体：

式中、ｍは１～４の整数を表し；ｎは１～４の整数を表し；ＺはＮ又はＣを表し；

Ｙは－ＮＲ^{2}－Ｃ$_{1～6}$アルキル－ＣＯ－ＮＲ^{4}－、－Ｃ$_{1～4}$アルキル－ＮＲ^{9}－Ｃ$_{1～4}$アルキル－、Ｃ$_{1～6}$アルキル－ＣＯ－Ｈｅｔ^{10}－、－Ｈｅｔ^{11}－ＣＯ－Ｃ$_{1～6}$アルキル－、－Ｈｅｔ^{12}－Ｃ$_{1～6}$アルキル－、－ＣＯ－Ｈｅｔ^{13}－Ｃ$_{1～6}$アルキル－、－ＣＯ－ＮＲ^{10}－Ｃ$_{1～6}$アルキル－、－Ｈｅｔ^{1}－Ｃ$_{1～6}$アルキル－ＣＯ－ＮＲ^{5}－、又は－Ｈｅｔ^{2}－ＣＯ－ＮＲ^{6}－を表し、ここで－ＮＲ^{2}－Ｃ$^{1～6}$アルキル－ＣＯ－ＮＲ^{4}－又は－Ｈｅｔ^{1}－Ｃ$_{1～6}$アルキル－ＣＯ－ＮＲ^{5}－中の－Ｃ$_{1～6}$アルキル－リンカーは任意にヒドロキシ、メトキシ、アミノカルボニル、ハロ、フェニル、インドリル、メチルスルフィド、チオール

、ヒドロキシフェニル、シアノフェニル、アミノ及びヒドロキシカルボニルから選択される１つの置換基で置換されるか又は可能な場合には２つ以上の置換基で置換され；

　X^1は直接結合、$C_{1\sim4}$アルキル、$C_{1\sim4}$アルキルオキシー、$C_{1\sim4}$アルキル－ＣＯ－、$C_{2\sim4}$アルケニル、$C_{2\sim4}$アルキニル又は$C_{1\sim4}$アルキル－NR^3－を表し、ここでかかる$C_{1\sim4}$アルキル又は$C_{2\sim4}$アルケニルは任意に１つのハロ置換基で置換されるか又は可能な場合には２つ以上のハロ置換基で置換され；

　X^2は直接結合、$C_{1\sim4}$アルキル、$C_{1\sim4}$アルキルオキシー、$C_{1\sim4}$アルキル－ＣＯ－、$C_{2\sim4}$アルケニル、$C_{2\sim4}$アルキニル、又は$C_{1\sim4}$アルキル－NR^7－を表し、ここでかかる$C_{1\sim4}$アルキル又は$C_{2\sim4}$アルケニルは任意に１つのハロ置換基で置換されるか又は可能な場合には２つ以上のハロ置換基で置換され；

　R^1及びR^8はそれぞれ独立して水素、Ｈｅｔ^{14}、シアノ、ハロ、ヒドロキシ、$C_{1\sim6}$アルコキシー、$C_{1\sim6}$アルキルー、モノー若しくはジ（$C_{1\sim4}$アルキル）アミノーカルボニルー、モノー若しくはジ（$C_{1\sim4}$アルキル）アミノースルホニル、ハロで置換された$C_{1\sim6}$アルコキシを表し、あるいはR^1はヒドロキシ若しくはハロから選択される１つの置換基で置換されたか又は可能な場合には２つ以上の置換基で置換された$C_{1\sim6}$アルキルを表し；

　R^2及びR^9はそれぞれ独立して水素、$C_{1\sim4}$アルキル、$C_{2\sim4}$アルケニル、Ｈｅｔ^3、Ｈｅｔ^4－$C_{1\sim4}$アルキルー、Ｈｅｔ^5－$C_{1\sim4}$アルキルカルボニルー、モノー若しくはジ（$C_{1\sim4}$アルキル）アミノ－$C_{1\sim4}$アルキルーカルボニルー、あるいは任意に水素、ヒドロキシ、アミノ若しくは$C_{1\sim4}$アルキルオキシから選択される１つの置換基で置換されたか又は可能な場合には２つ以上の置換基で置換されたフェニルを表し；

　R^3及びR^7はそれぞれ独立して水素、$C_{1\sim4}$アルキル、Ｈｅｔ^6、Ｈｅｔ^7－$C_{1\sim4}$アルキルー、任意にＨｅｔ^8－$C_{1\sim4}$アルキルアミノカルボニルで置換された$C_{2\sim4}$アルケニルカルボニル、$C_{2\sim4}$アルケニルスルホニルー、$C_{1\sim4}$アルキルオキシ$C_{1\sim4}$アルキルー、あるいは任意に水素、ヒドロキシ、アミノ若しくは$C_{1\sim4}$アルキルオキシから選択される１つの置換基で置換されたか又は可能な場合には２つ以上の置換基で置換されたフェニルを表し；

　Ｒ４、Ｒ５、Ｒ６及びR^{10}はそれぞれ独立して水素を表すか又は任意にヒドロキシ、Ｈｅｔ^{9}若しくは$C_{1\sim4}$アルキルオキシで置換された$C_{1\sim4}$アルキルを表し；

　Ｈｅｔ^{1}及びＨｅｔ^{2}はそれぞれ独立してピロリジニル、ピペリジニル、ピペラジニル、ピリジニル、ピリミジニル、ピラジニル、イミダゾリジニル又はピラゾリジニルから選択される複素環を表し、ここでかかるＨｅｔ^{1}及びＨｅｔ^{2}は任意にアミノ、ヒドロキシ、$C_{1\sim4}$アルキル、ヒドロキシ－$C_{1\sim4}$アルキル（alIcyl）－、フェニル、フェニル－$C_{1\sim4}$アルキルー、$C_{1\sim4}$アルキルーオキシ－$C_{1\sim4}$アルキルーモノー若しくはジ（$C_{1\sim4}$アルキル）アミノー若しくはアミノーカルボニルーで置換され；

　Ｈｅｔ^{3}及びＨｅｔ^{6}はそれぞれ独立してピロリジニル又はピペリジニルから選択される複素環を表し、ここでかかるＨｅｔ^{3}及びＨｅｔ^{6}は任意に$C_{1\sim4}$アルキル、$C_{3\sim6}$シクロアルキル、ヒドロキシ－$C_{1\sim4}$アルキルー、$C_{1\sim4}$アルキルオキシ$C_{1\sim4}$アルキル又はポリヒドロキシ－$C_{1\sim4}$アルキルーから選択される１つの置換基で置換されるか又は可能な場合には２つ以上の置換基で置換され；

　Ｈｅｔ^4、Ｈｅｔ^{7}及びＨｅｔ^{9}はそれぞれ独立してモルホリニル、ピロリジニル、ピペラジニル又はピペリジニルから選択される複素環を表し、ここでかかるＨｅｔ^4、Ｈｅｔ^{7}及びＨｅｔ^{9}は任意に$C_{1\sim4}$アルキル、$C_{3\sim6}$シクロアルキル、ヒドロキシ－$C_{1\sim4}$アルキルー、$C_{1\sim4}$アルキルオキシ$C_{1\sim4}$アルキル又はポリヒドロキシ－$C_{1\sim4}$アルキルーから選択される１つの置換基で置換されるか又は可能な場合には２つ以上の置換基で置換され；

　Ｈｅｔ^{5}はモルホリニル、ピロリジニル、ピペラジニル又はピペリジニルから選択される複素環を表し、ここでかかるＨｅｔ^{5}は任意に$C_{1\sim4}$アルキル、$C_{3\sim6}$シクロアルキル、ヒドロキシ－$C_{1\sim4}$アルキルー、$C_{1\sim4}$アルキルオキシ$C_{1\sim4}$アルキル又はポリヒドロキシ－$C_{1\sim4}$アルキルーから選択される１つの置換基で置換されるか又は可能な場合には

２つ以上の置換基で置換され；

Ｈｅｔ^{10}、Ｈｅｔ^{11}及びＨｅｔ^{13}はそれぞれ独立してピロリジニル、ピペリジニル、ピペラジニル、ピリジニル、ピリミジニル、ピラジニル、イミダゾリジニル又はピラゾリジニルから選択される複素環を表し、ここでかかるＨｅｔ^{10}、Ｈｅｔ^{11}及びＨｅｔ^{13}は任意にアミノ、ヒドロキシ、$C_{1\sim4}$アルキル、ヒドロキシ－$C_{1\sim4}$アルキル－、フェニル、フェニル－$C_{1\sim4}$アルキル－、$C_{1\sim4}$アルキル－オキシ－$C_{1\sim4}$アルキル－、アミノ－カルボニル－又はモノ－若しくはジ（$C_{1\sim4}$アルキル）アミノ－で置換され；

Ｈｅｔ^{12}はピロリジニル、ピペリジニル、ピペラジニル、ピリジニル、ピリミジニル、ピラジニル、イミダゾリジニル又はピラゾリジニルから選択された複素環を表し、ここでかかるＨｅｔ^{12}は任意にアミノ、ヒドロキシ、$C_{1\sim4}$アルキル、ヒドロキシ－$C_{1\sim4}$アルキル－、フェニル、フェニル－$C_{1\sim4}$アルキル－、$C_{1\sim4}$アルキル－オキシ－$C_{1\sim4}$アルキル－；モノ－若しくはジ（$C_{1\sim4}$アルキル）アミノ－若しくはアミノ－カルボニル－で置換され；

Ｈｅｔ^{14}はモルホリニル；ピロリジニル；ピペラジニル；イミダゾリル；ピロリル；２，３，４－トリアザピロリル；１，２，３－トリアゾリル；ピラゾリル；又はピペリジニルから選択される複素環を表し、ここでかかるＨｅｔ^{14}は任意に$C_{1\sim4}$アルキル、$C_{3\sim6}$シクロアルキル、ヒドロキシ－$C_{1\sim4}$アルキル－、$C_{1\sim4}$アルキルオキシ$C_{1\sim4}$アルキル又はポリヒドロキシ－$C_{1\sim4}$アルキル－から選択される１つの置換基で置換されるか又は可能な場合には２つ以上の置換基で置換され；具体的にはＨｅｔ^{14}はモルホリニル；ピロリジニル；ピロリル；２，３，４－トリアザピロリル；ピペラジニル又はピペリジニルから選択される複素環を表し、ここでかかるＨｅｔ^{14}は任意に$C_{1\sim4}$アルキル、$C_{3\sim6}$シクロアルキル、ヒドロキシ－$C_{1\sim4}$アルキル－、$C_{1\sim4}$アルキルオキシ$C_{1\sim4}$アルキル又はポリヒドロキシ－$C_{1\sim4}$アルキル－から選択される１つの置換基で置換されるか又は可能な場合には２つ以上の置換基で置換され；より具体的にはＨｅｔ^{14}はモルホリニル；ピロリジニル；ピペラジニル又はピペリジニルから選択される複素環を表し、ここでかかるＨｅｔ^{14}は任意に$C_{1\sim4}$アルキル、$C_{3\sim6}$シクロアルキル、ヒドロキシ－$C_{1\sim4}$アルキル－、$C_{1\sim4}$アルキルオキシ$C_{1\sim4}$アルキル又はポリヒドロキシ－$C_{1\sim4}$アルキル-から選択される１つの置換基で置換されるか又は可能な場合には２つ以上の置換基で置換される。

【０１１８】

式（７）の化合物はＪａｎｓｓｅｎ　Ｐｈａｒｍａｃｅｕｔｉｃａ　Ｎ．Ｖ．に譲渡された国際公開第２００７／００３５２５号に公開される。

【０１１９】

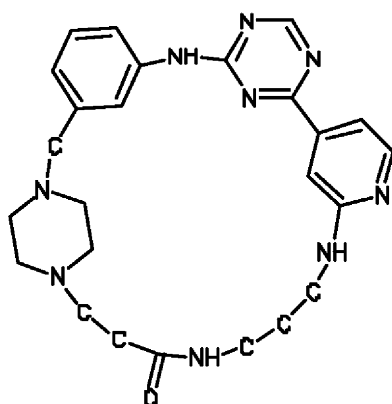
一実施形態では、環式アニリン－ピリジノトリアジンは式（１４）の化合物である。

【０１２０】

一実施形態では、環式アニリン－ピリジノトリアジンは式（１５）の化合物である。

【０１２１】

【化１５】



式（１５）：１，８，１０，１２，１７，１９，２３，２７，３３－ノナアザペンタシクロ［２５．２．２．１～３，７～．１～９，１３～．１～１４，１８～］テトラトリア

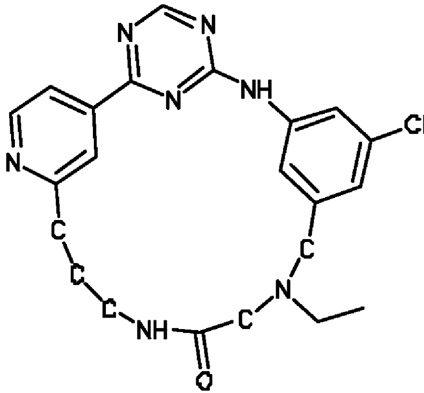
コンター３（３４），４，６，９（３３），１０，１２，１４（３２），１５，１７－ノナエン－２４－オン本明細書において「化合物１３」として参照される。

【０１２２】

一実施形態では、環式アニリン－ピリジノトリアジンは式（１６）の化合物である。

【０１２３】

【化１６】



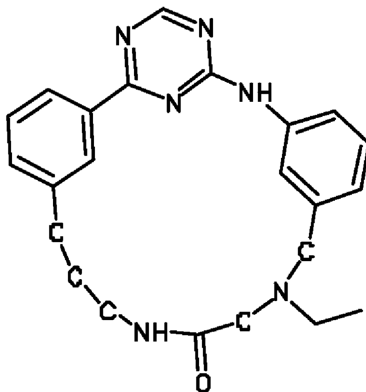
式（１６）：１０－クロロ－１４－エチル－３，５，７，１４，１７，２２，２７－ヘプタアザテトラシクロ［１９．３．１．１～２，６～．１～８，１２～］ヘプタコサ－１（２５），２（２７），３，５，８（２６），９，１１，２１，２３－ノナエン－１６－オン本明細書において「化合物１４」として参照される。

【０１２４】

一実施形態では、環式アニリン－ピリジノトリアジンは式（１７）の化合物である。

【０１２５】

【化１７】



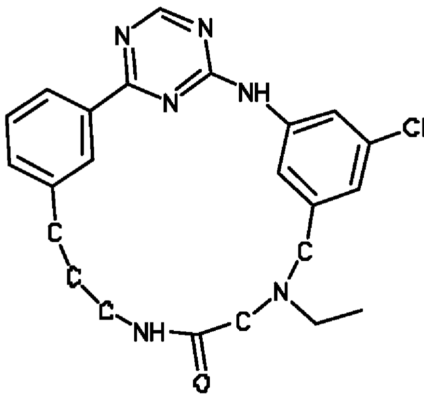
式（１７）：１４－エチル－３，５，７，１４，１７，２７－ヘキサアザテトラシクロ［１９．３．１．１～２，６～．１～８，１２～］ヘプタコサ－１（２５），２（２７），３，５，８（２６），９，１１，２１，２３－ノナエン－１６－オン本明細書において「化合物１５」として参照される。

【０１２６】

一実施形態では、環式アニリン－ピリジノトリアジンは式（１８）の化合物である。

【０１２７】

【化１８】



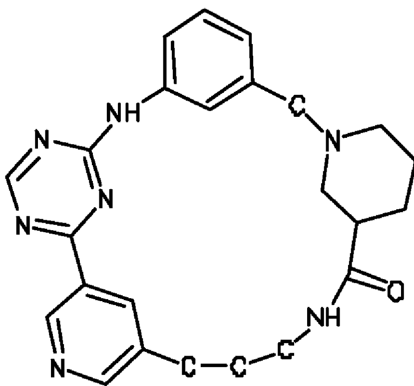
式（１８）：１０－クロロ－１４－エチル－３，５，７，１４，１７，２７－ヘキサアザテトラシクロ［１９．３．１．１～２，６～．１～８，１２～］ヘプタコサ－１（２５），２（２７），３，５，８（２６），９，１１，２１，２３－ノナエン－１６－オン本明細書において「化合物１６」として参照される。

【０１２８】

一実施形態では、環式アニリン－ピリジノトリアジンは式（１９）の化合物である。

【０１２９】

【化１９】



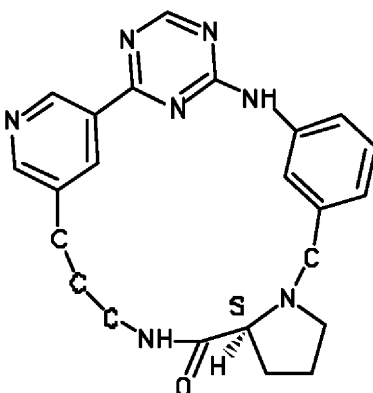
式（１９）：３，５，７，１４，２０，２６，３１－ヘプタアザペンタシクロ［２２．３．１．１～２，６～．１～８，１２～．１～１４，１８～］ヘントリアコンタ－１（２８），２（３１），３，５，８（３０），９，１１，２４，２６－ノナエン－１９－オン本明細書において「化合物１７」として参照される。

【０１３０】

一実施形態では、環式アニリン－ピリジノトリアジンは式（２０）の化合物である。

【０１３１】

【化２０】



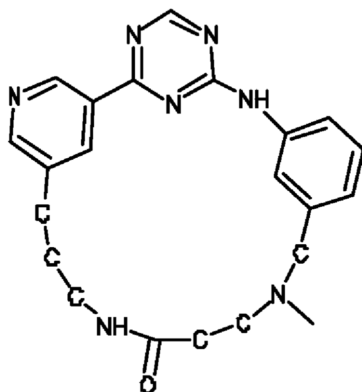
式（２０）：（１８Ｓ）－３，５，７，１４，２０，２６，３０－ヘプタアザペンタシクロ［２２．３．１．１～２，６～．１～８，１２～．０～１４，１８～］トリアコンタ－１（２８），２（３０），３，５，８（２９），９，１１，２４，２６－ノナエン－１９－オン本明細書において「化合物１８」として参照される。

【０１３２】

一実施形態では、環式アニリン－ピリジノトリアジンは式（２１）の化合物である。

【０１３３】

【化２１】



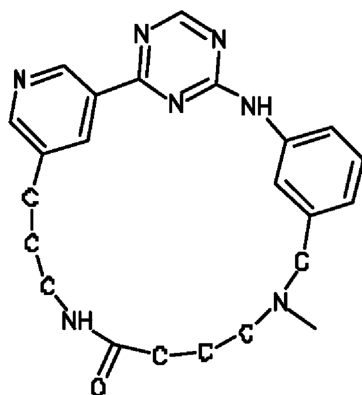
式（２１）：１４－メチル－３，５，７，１４，１８，２４，２８－ヘプタアザテトラシクロ［２０．３．１．１～２，６～．１～８，１２～］オクタコサ－１（２６），２（２８），３，５，８（２７），９，１１，２２，２４－ノナエン－１７－オン本明細書において「化合物１９」として参照される。

【０１３４】

一実施形態では、環式アニリン－ピリジノトリアジンは式（２２）の化合物である。

【０１３５】

【化２２】



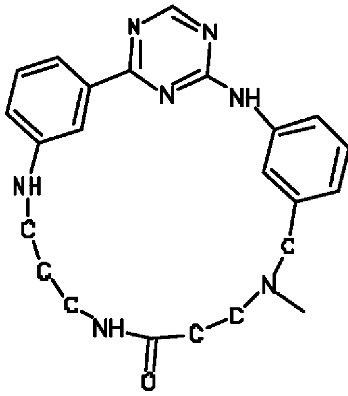
式（２２）：１４－メチル－３，５，７，１４，１９，２５，２９－ヘプタアザテトラシクロ［２１．３．１．１～２，６～．１～８，１２～］ノナコサ－１（２７），２（２９），３，５，８（２８），９，１１，２３，２５－ノナエン－１８－オン本明細書において「化合物２０」として参照される。

【０１３６】

一実施形態では、環式アニリン－ピリジノトリアジンは式（２３）の化合物である。

【０１３７】

【化２３】



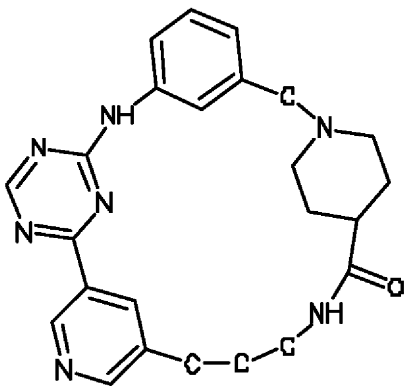
式（２３）：１４－メチル－３，５，７，１４，１８，２２，２９－ヘプタアザテトラシクロ［２１．３．１．１～２，６～．１～８，１２～］ノナコサ－１（２７），２（２９），３，５，８（２８），９，１１，２３，２５－ノナエン－１７－オン本明細書において「化合物２１」として参照される。

【０１３８】

一実施形態では、環式アニリン－ピリジノトリアジンは式（２４）の化合物である。

【０１３９】

【化２４】



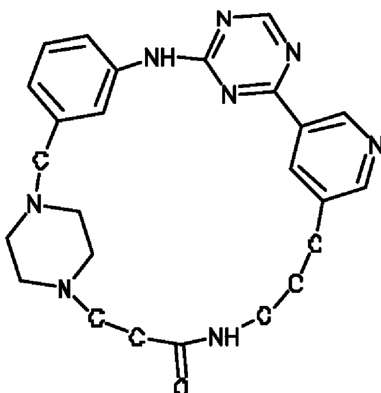
式（２４）：１，８，１０，１２，１６，２２，３０－ヘプタアザペンタシクロ［２２．２．２．１～３，７～．１～９，１３～．１～１４，１８～］ヘントリアコンタ－３（３１），４，６，９（３０），１０，１２，１４（２９），１５，１７－ノナエン－２３－オン本明細書において「化合物２２」として参照される。

【０１４０】

一実施形態では、環式アニリン－ピリジノトリアジンは式（２５）の化合物である。

【０１４１】

【化２５】



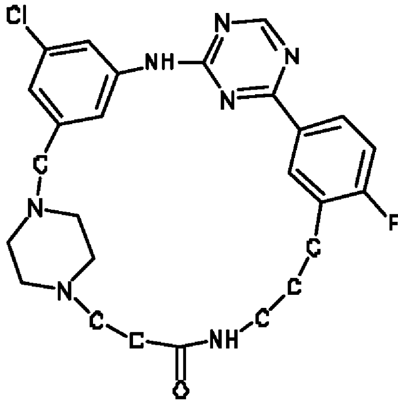
式（２５）：１，８，１０，１２，１６，２２，２６，３２－オクタアザペンタシクロ［２４．２．２．１～３，７～．１～９，１３～．１～１４，１８～］トリトリアコンタ－３（３３），４，６，９（３２），１０，１２，１４（３１），１５，１７－ノナエン－２３－オン本明細書において「化合物２３」として参照される。

【０１４２】

一実施形態では、環式アニリン－ピリジノトリアジンは式（２６）の化合物である。

【０１４３】

【化２６】



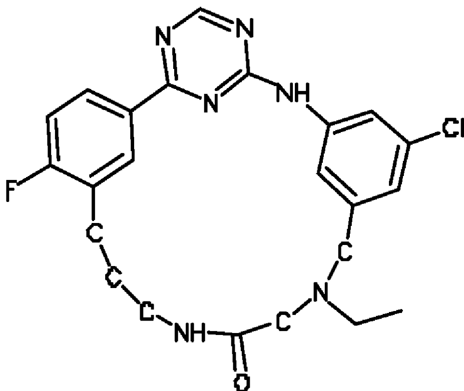
式（２６）：５－クロロ－１７－フルオロ－１，８，１０，１２，２２，２６，３２－ヘプタアザペンタシクロ［２４．２．２．１～３，７～．１～９，１３～．１～１４，１８～］トリトリアコンタ－３（３３），４，６，９（３２），１０，１２，１４（３１），１５，１７－ノナエン－２３－オン本明細書において「化合物２４」として参照される。

【０１４４】

一実施形態では、環式アニリン－ピリジノトリアジンは式（２７）の化合物である。

【０１４５】

【化２７】



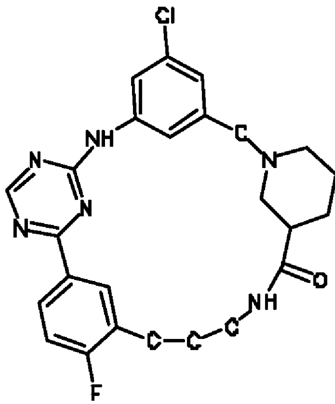
式（２７）：１０－クロロ－１４－エチル－２２－フルオロ－３，５，７，１４，１７，２７－ヘキサアザテトラシクロ［１９．３．１．１～２，６～．１～８，１２～］ヘプタコサ－１（２５），２（２７），３，５，８（２６），９，１１，２１，２３－ノナエン－１６－オン本明細書において「化合物２５」として参照される。

【０１４６】

一実施形態では、環式アニリン－ピリジノトリアジンは式（２８）の化合物である。

【０１４７】

【化２８】



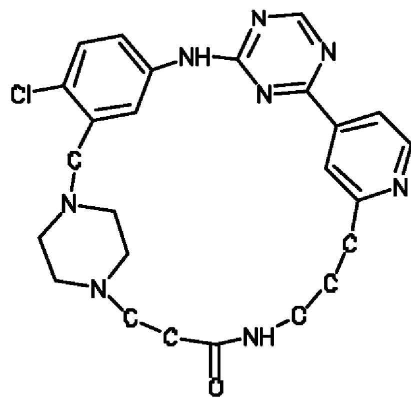
式（２８）：１０－クロロ－２５－フルオロ－３，５，７，１４，２０，３１－ヘキサアザペンタシクロ［２２．３．１．１～２，６～．１～８，１２～．１～１４，１８～］ヘントリアコンタ－１（２８），２（３１），３，５，８（３０），９，１１，２４，２６－ノナエン－１９－オン本明細書において「化合物２６」として参照される。

【０１４８】

一実施形態では、環式アニリン－ピリジノトリアジンは式（２９）の化合物である。

【０１４９】

【化２９】



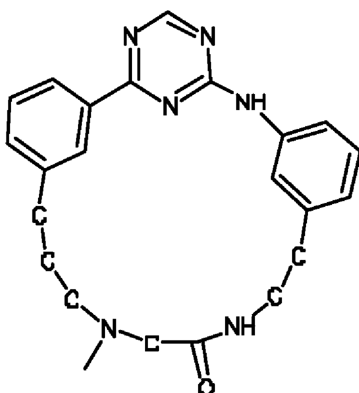
式（２９）：４－クロロ－１，８，１０，１２，１７，２２，２６，３２－オクタアザペンタシクロ［２４．２．２．１～３，７～．１～９，１３～．１～１４，１８～］トリトリアコンタ－３（３３），４，６，９（３２），１０，１２，１４（３１），１５，１７－ノナエン－２３－オン本明細書において「化合物２７」として参照される。

【０１５０】

一実施形態では、環式アニリン－ピリジノトリアジンは式（３０）の化合物である。

【０１５１】

【化３０】



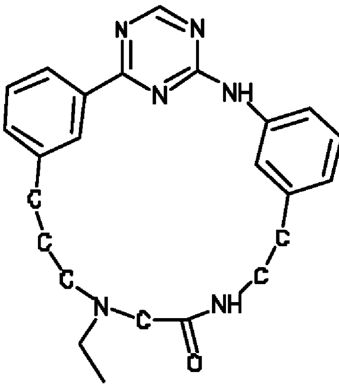
式（３０）：１８−メチル−３，５，７，１５，１８，２８−ヘキサアザテトラシクロ［２０．３．１．１〜２，６〜．１〜８，１２〜］オクタコサ−１（２６），２（２８），３，５，８（２７），９，１１，２２，２４−ノナエン−１６−オン本明細書において「化合物２８」として参照される。

【０１５２】

一実施形態では、環式アニリン−ピリジノトリアジンは式（３１）の化合物である。

【０１５３】

【化３１】



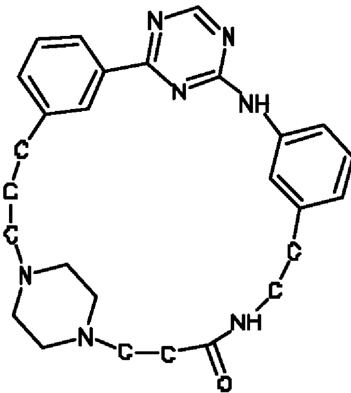
式（３１）：１８−エチル−３，５，７，１５，１８，２８−ヘキサアザテトラシクロ［２０．３．１．１〜２，６〜．１〜８，１２〜］オクタコサ−１（２６），２（２８），３，５，８（２７），９，１１，２２，２４−ノナエン−１６−オン本明細書において「化合物２９」として参照される。

【０１５４】

一実施形態では、環式アニリン−ピリジノトリアジンは式（３２）の化合物である。

【０１５５】

【化３２】



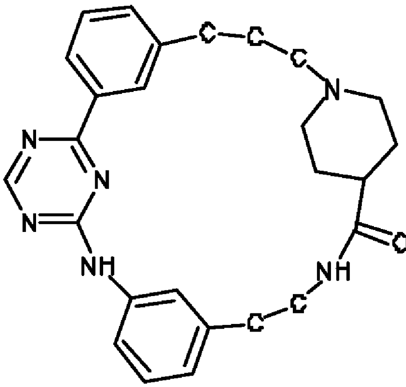
式（３２）：１，８，１０，１２，１７，１９，２３，２７，３３−ノナアザペンタシクロ［２５．２．２．１〜３，７〜．１〜９，１３〜．１〜１４，１８〜］テトラトリアコンタ−３（３４），４，６，９（３３），１０，１２，１４（３２），１５，１７−ノナエン−２４−オン本明細書において「化合物３０」として参照される。

【０１５６】

一実施形態では、環式アニリン−ピリジノトリアジンは式（３３）の化合物である。

【０１５７】

【化３３】



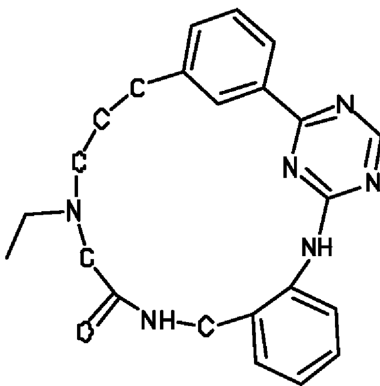
式（３３）：１，１１，１３，１５，２３，３１－ヘキサアザペンタシクロ［２３．２．２．１～５，９～．１～１０，１４～．１～１６，２０～］ドトリアコンター５（３２），６，８，１０（３１），１１，１３，１６（３０），１７，１９－ノナエン－２４－オン本明細書において「化合物３１」として参照される。

【０１５８】

一実施形態では、環式アニリン－ピリジノトリアジンは式（３４）の化合物である。

【０１５９】

【化３４】



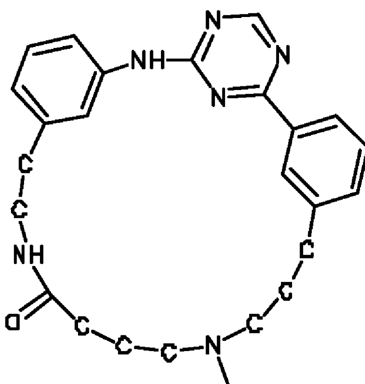
式（３４）：１５－エチル－１３，１４，１５，１６，１８，１９－ヘキサヒドロ－１Ｈ－６，２－（アゼノ）－７，１１－（メテノ）－１，３，５，１５，１８－ベンゾペンタアザシクロヘニコシン－１７（１２Ｈ）－オン本明細書において「化合物３２」として参照される。

【０１６０】

一実施形態では、環式アニリン－ピリジノトリアジンは式（３５）の化合物である。

【０１６１】

【化３５】



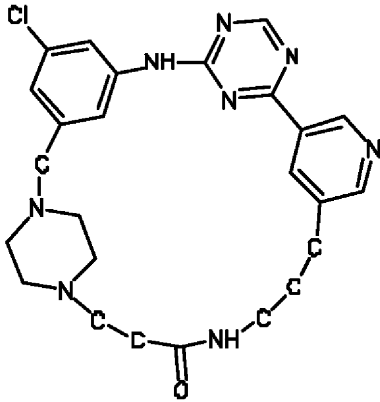
式（３５）：２０－メチル－３，５，７，１５，２０，３０－ヘキサアザテトラシクロ［２２．３．１．１～２，６～．１～８，１２～］トリアコンタ－１（２８），２（３０），３，５，８（２９），９，１１，２４，２６－ノナエン－１６－オン本明細書において「化合物３３」として参照される。

【０１６２】

一実施形態では、環式アニリン－ピリジノトリアジンは式（３６）の化合物である。

【０１６３】

【化３６】



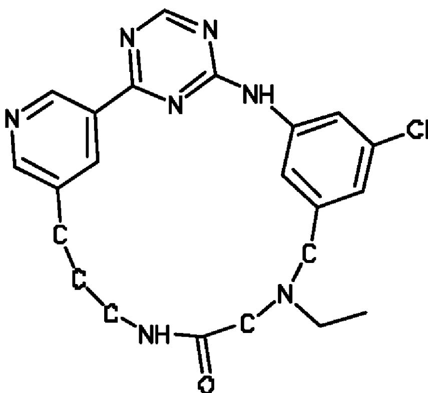
式（３６）：５－クロロ－１，８，１０，１２，１６，２２，２６，３２－オクタアザペンタシクロ［２４．２．２．１～３，７～．１～９，１３～．１～１４，１８～］トリトリアコンタ－３（３３），４，６，９（３２），１０，１２，１４（３１），１５，１７－ノナエン－２３－オン本明細書において「化合物３４」として参照される。

【０１６４】

一実施形態では、環式アニリン－ピリジノトリアジンは式（３７）の化合物である。

【０１６５】

【化３７】



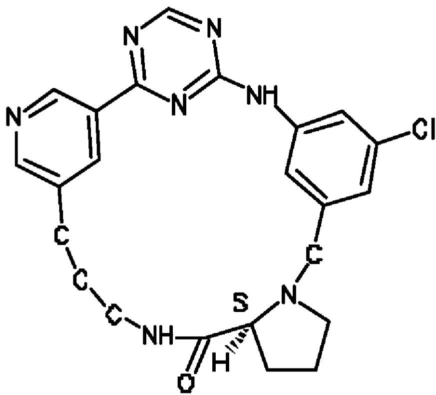
式（３７）：１０－クロロ－１４－エチル－３，５，７，１４，１７，２３，２７－ヘプタアザテトラシクロ［１９．３．１．１～２，６～．１～８，１２～］ヘプタコサ－１（２５），２（２７），３，５，８（２６），９，１１，２１，２３－ノナエン－１６－オン本明細書において「化合物３５」として参照される。

【０１６６】

一実施形態では、環式アニリン－ピリジノトリアジンは式（３８）の化合物である。

【０１６７】

【化３８】



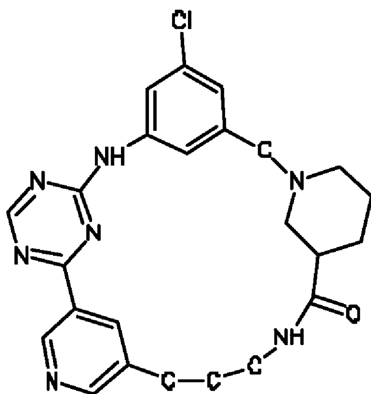
式（３８）：（１８Ｓ）－１０－クロロ－３，５，７，１４，２０，２６，３０－ヘプタアザペンタシクロ［２２．３．１．１～２，６～．１～８，１２～．０～１４，１８～］トリアコンタ－１（２８），２（３０），３，５，８（２９），９，１１，２４，２６－ノナエン－１９－オン本明細書において「化合物３６」として参照される。

【０１６８】

一実施形態では、環式アニリン－ピリジノトリアジンは式（３９）の化合物である。

【０１６９】

【化３９】



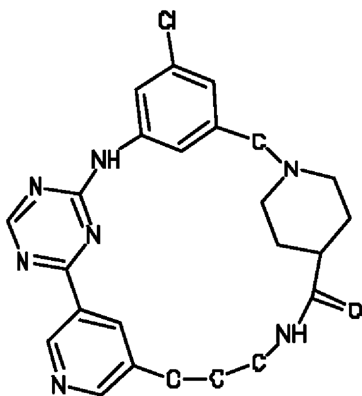
式（３９）：１０－クロロ－３，５，７，１４，２０，２６，３１－ヘプタアザペンタシクロ［２２．３．１．１～２，６～．１～８，１２～．１～１４，１８～］ヘントリアコンタ－１（２８），２（３１），３，５，８（３０），９，１１，２４，２６－ノナエン－１９－オン本明細書において「化合物３７」として参照される。

【０１７０】

一実施形態では、環式アニリン－ピリジノトリアジンは式（４０）の化合物である。

【０１７１】

【化４０】



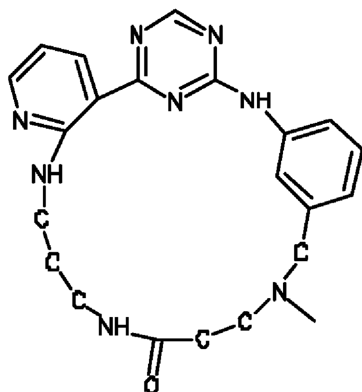
式（４０）：５－クロロ－１，８，１０，１２，１６，２２，３０－ヘプタアザペンタシクロ［２２．２．２．１～３，７～．１～９，１３～．１～１４，１８～］ヘントリアコンター３（３１），４，６，９（３０），１０，１２，１４（２９），１５，１７－ノナエン－２３－オン本明細書において「化合物３８」として参照される。

【０１７２】

一実施形態では、環式アニリン－ピリジノトリアジンは式（４１）の化合物である。

【０１７３】

【化４１】



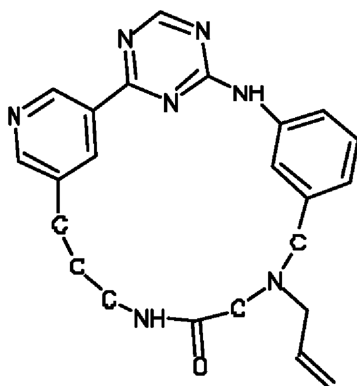
式（４１）：９－メチル－２，３，４，５，７，８，９，１０－オクタヒドロ－１６Ｈ－１７，２１－（アゼノ）－１１，１５－（メテノ）ピリド［３，２－ｇ］［１，３，５，９，１３，１７］ヘキサアザシクロトリコシン－６（１Ｈ）－オン本明細書において「化合物３９」として参照される。

【０１７４】

一実施形態では、環式アニリン－ピリジノトリアジンは式（４２）の化合物である。

【０１７５】

【化４２】



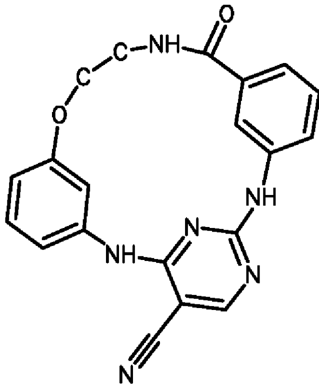
式（４２）：１４－プロパ－２－エン－１－イル－３，５，７，１４，１７，２３，２７－ヘプタアザテトラシクロ［１９．３．１．１～２，６～．１～８，１２～］ヘプタコサ－１（２５），２（２７），３，５，８（２６），９，１１，２１，２３－ノナエン－１６－オン本明細書において「化合物４０」として参照される。

【０１７６】

一実施形態では、環式アニリン－ピリジノトリアジンは式（４３）の化合物である。

【０１７７】

【化４３】



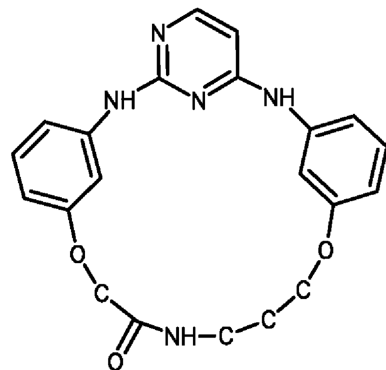
式（４３）：１８－オキソ－１４－オキサ－２，４，８，１７，２５－ペンタアザテトラシクロ［１７．３．１．１～３，７～．１～９，１３～］ペンタコサ－１（２３），３（２５），４，６，９（２４），１０，１２，１９，２１－ノナエン－６－カルボニトリル本明細書において「化合物４１」として参照される。

【０１７８】

一実施形態では、環式アニリン－ピリジノトリアジンは式（４４）の化合物である。

【０１７９】

【化４４】



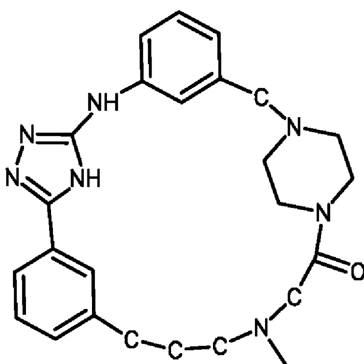
式（４４）：１４，２１－ジオキサ－２，４，８，１８，２８－ペンタアザテトラシクロ［２０．３．１．１～３，７～．１～９，１３～］オクタコサ－１（２６），３（２８），４，６，９（２７），１０，１２，２２，２４－ノナエン－１９－オン本明細書において「化合物４２」として参照される。

【０１８０】

一実施形態では、環式アニリン－ピリジノトリアジンは式（４５）の化合物である。

【０１８１】

【化４５】



式（４５）：２１－メチル－１，８，１０，１１，２１，２４，３０－ヘプタアザペンタシクロ［２２．２．２．１～３，７～．１～９，１２～．１～１３，１７～］ヘントリ

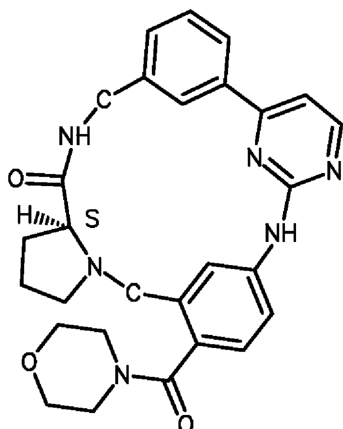
アコンター３（３１），４，６，９，１１，１３（２９），１４，１６－オクタエン－２３－オン本明細書において「化合物４３」として参照される。

【０１８２】

一実施形態では、環式アニリン－ピリジノトリアジンは式（４６）の化合物である。

【０１８３】

【化４６】



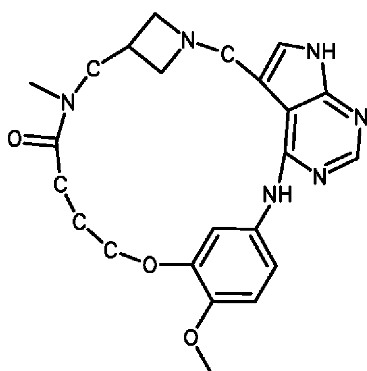
式（４６）：（１８Ｓ）－１１－（モルホリン－４－イルカルボニル）－５，７，１４，２０，２８－ペンタアザペンタシクロ［２０．３．１．１～２，６～．１～８，１２～．０～１４，１８～］オクタコサ－１（２６），２（２８），３，５，８（２７），９，１１，２２，２４－ノナエン－１９－オン本明細書において「化合物４４」として参照される。

【０１８４】

一実施形態では、環式アニリン－ピリジノトリアジンは式（４７）の化合物である。

【０１８５】

【化４７】



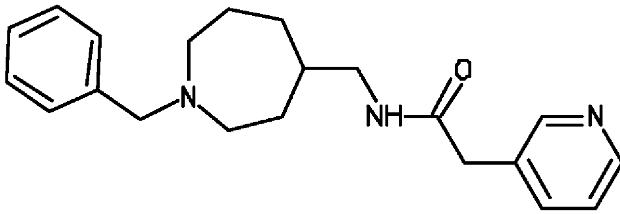
式（４７）：１０－メトキシ－１７－メチル－２，１４，１５，１７，１８，１９，２０，２２－オクタヒドロ－６Ｈ－１９，２１－メタノ－７，１１－（メテノ）－１２－オキサ－２，３，５，６，１７，２１－ヘキサアザシクロイコサ［１，２，３－ｃｄ］インデン－１６（１３Ｈ）－オン本明細書において「化合物４５」として参照される。

【０１８６】

一実施形態では、少なくとも１つの他の因子は式（４８）の化合物である。

【０１８７】

【化４８】



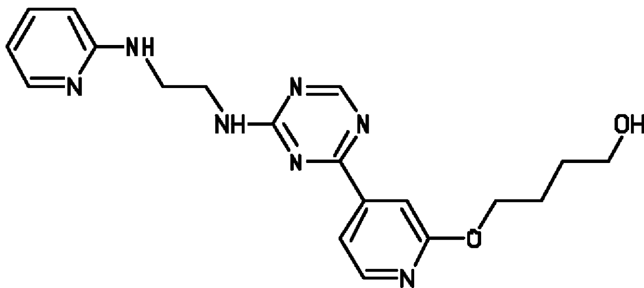
式（４８）Ｎ－｛［１－（フェニルメチル）アゼパン－４－イル］メチル｝－２－ピリジン－３－イルアセトアミド本明細書において「化合物４６」として参照される。

【０１８８】

一実施形態では、少なくとも１つの他の因子は式（４９）の化合物である。

【０１８９】

【化４９】



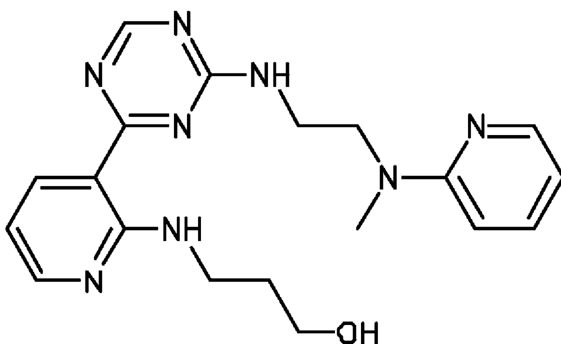
式（４９）４－｛［４－（４－｛［２－（ピリジン－２－イルアミノ）エチル］アミノ｝－１，３，５－トリアジン－２－イル）ピリジン－２－イル］オキシ｝ブタン－１－オール本明細書において「化合物４７」として参照される。

【０１９０】

一実施形態では、少なくとも１つの他の因子は式（５０）の化合物である。

【０１９１】

【化５０】



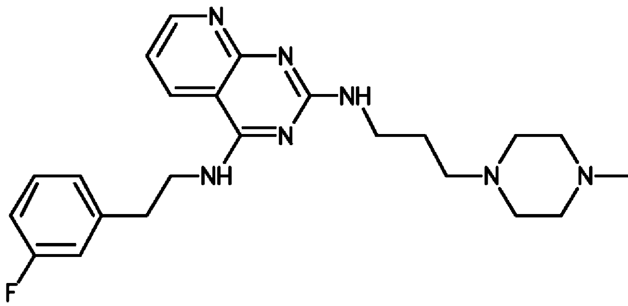
式（５０）３－（｛３－［４－（｛２－［メチル（ピリジン－２－イル）アミノ］エチル｝アミノ）－１，３，５－トリアジン－２－イル］ピリジン－２－ｙｌ｝アミノ）プロパン－１－オール本明細書において「化合物４８」として参照される。

【０１９２】

一実施形態では、少なくとも１つの他の因子は式（５１）の化合物である。

【０１９３】

【化５１】



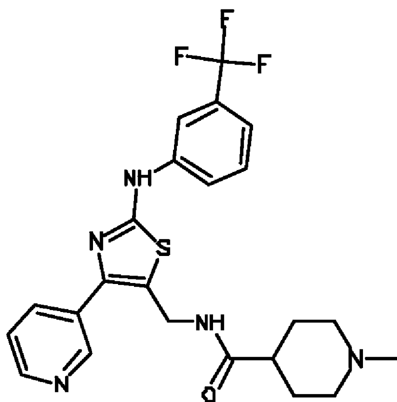
式（５１）Ｎ～４～－［２－（３－フルオロフェニル）エチル］－Ｎ～２～－［３－（４－メチルピペラジン－１－イル）プロピル］ピリド［２，３－ｄ］ピリミジン－２，４－ジアミン本明細書において「化合物４９」として参照される。

【０１９４】

一実施形態では、少なくとも１つの他の因子は式（５２）の化合物である。

【０１９５】

【化５２】



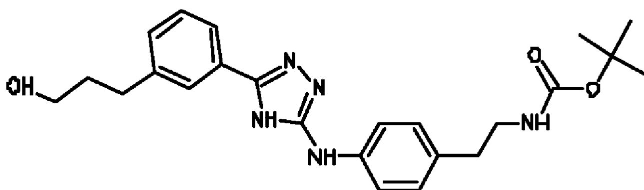
式（５２）１－メチル－Ｎ－［（４－ピリジン－３－イル－２－｛［３－（トリフルオロメチル）フェニル］アミノ｝－１，３－チアゾール－５－イル）メチル］ピペリジン－４－カルボキサミド本明細書において「化合物５０」として参照される。

【０１９６】

一実施形態では、少なくとも１つの他の因子は式（５３）の化合物である。

【０１９７】

【化５３】



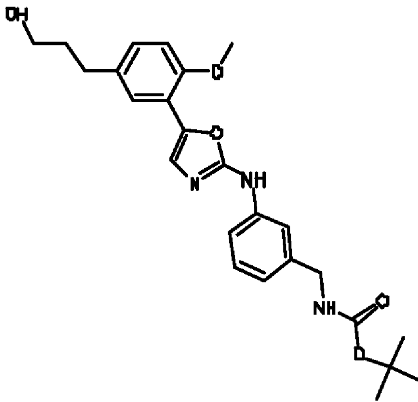
式（５３）１，１－ジメチルエチル｛２－［４－（｛５－［３－（３－ヒドロキシプロピル）フェニル］－４Ｈ－１，２，４－トリアゾール－３－イル｝アミノ）フェニル］エチル｝カルバメート本明細書において「化合物５１」として参照される。

【０１９８】

一実施形態では、少なくとも１つの他の因子は式（５４）の化合物である。

【０１９９】

【化５４】



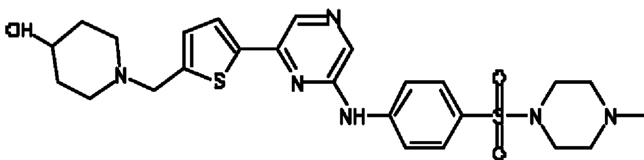
式（５４）１，１－ジメチルエチル｛［３－（｛５－［５－（３－ヒドロキシプロピル）－２－（メチルオキシ）フェニル］－１，３－オキサゾール－２－イル｝アミノ）フェニル］メチル｝カルバメート本明細書において「化合物５２」として参照される。

【０２００】

一実施形態では、少なくとも１つの他の因子は式（５５）の化合物である。

【０２０１】

【化５５】



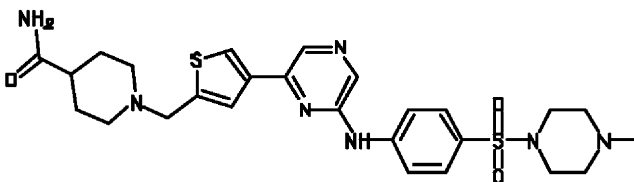
式（５５）１－（｛５－［６－（｛４－［（４－メチルピペラジン－１－イル）スルホニル］フェニル｝アミノ）ピラジン－２－イル］チオフェン－２－イル｝メチル）ピペリジン－４－オール本明細書において「化合物５３」として参照される。

【０２０２】

一実施形態では、少なくとも１つの他の因子は式（５６）の化合物である。

【０２０３】

【化５６】



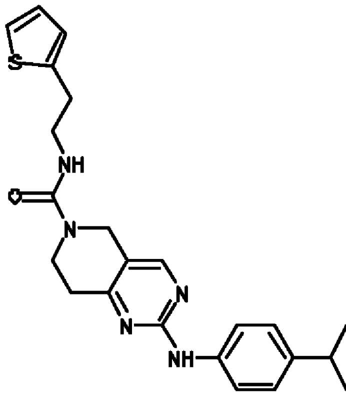
式（５６）１－（｛４－［６－（｛４－［（４－メチルピペラジン－１－イル）スルホニル］フェニル｝アミノ）ピラジン－２－イル］チオフェン－２－イル｝メチル）ピペリジン－４－カルボキサミド本明細書において「化合物５４」として参照される。

【０２０４】

一実施形態では、少なくとも１つの他の因子は式（５７）の化合物である。

【０２０５】

【化５７】



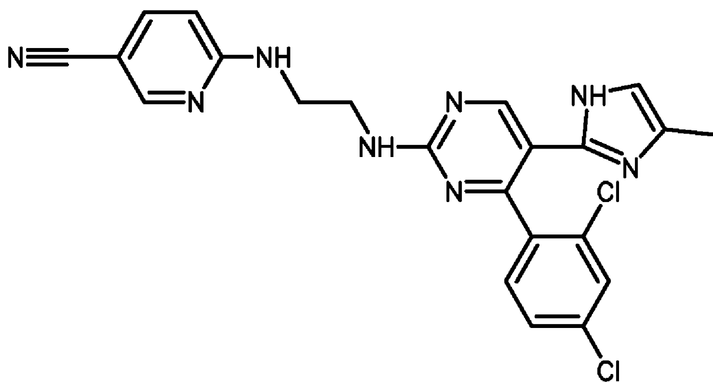
式（５７）２－｛［４－（１－メチルエチル）フェニル］アミノ｝－Ｎ－（２－チオフェン－２－イルエチル）－７，８－ジヒドロピリド［４，３－ｄ］ピリミジン－６（５Ｈ）－カルボキサミド本明細書において「化合物５５」として参照される。

【０２０６】

一実施形態では、少なくとも１つの他の因子は式（５８）の化合物である。

【０２０７】

【化５８】



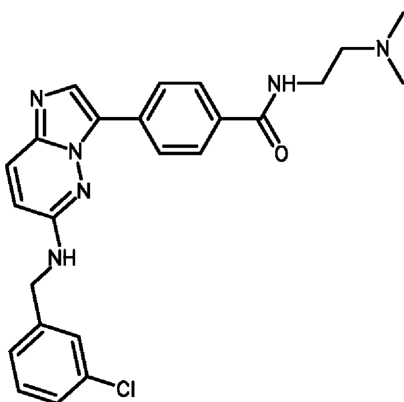
式（５８）６－［（２－｛［４－（２，４－ジクロロフェニル）－５－（４－メチル－１Ｈ－イミダゾール－２－イル）ピリミジン－２－イル］アミノ｝エチル）アミノ］ピリジン－３－カルボニトリル本明細書において「化合物５６」として参照される。

【０２０８】

一実施形態では、少なくとも１つの他の因子は式（５９）の化合物である。

【０２０９】

【化５９】



式（５９）４－（６－｛［（３－クロロフェニル）メチル］アミノ｝イミダゾ［１，２－ｂ］ピリダジン－３－イル）－Ｎ－［２－（ジメチルアミノ）エチル］ベンズアミド本明細書において「化合物５７」として参照される。

【０２１０】
　胚体内胚葉系に特徴的なマーカーを発現する細胞の検出
　胚体内胚葉系に特徴的なマーカーを発現している細胞の形成は、以下の特定のプロトコルの前後に、マーカーの存在に関して試験することにより決定することができる。多能性幹細胞は、一般にかかるマーカーを発現しない。したがって、多能性細胞の分化は、細胞がそれらの発現を開始した際に検出される。
【０２１１】
　分化効率は、処理した細胞集団を、胚体内胚葉系に特徴的なマーカーを発現している細胞により発現されたタンパク質マーカーを特異的に認識する薬剤（例えば、抗体等）に曝露することにより測定することができる。
【０２１２】
　培養又は単離された細胞中のタンパク質及び核酸マーカーの発現を評価する方法は、当該技術分野において標準技術である。これらには、定量的逆転写ポリメラーゼ連鎖反応（ＲＴ－ＰＣＲ）、ノーザンブロット法、インサイツハイブリダイゼーション（例えば、Ｃｕｒｒｅｎｔ　Ｐｒｏｔｏｃｏｌｓ　ｉｎ　Ｍｏｌｅｃｕｌａｒ　Ｂｉｏｌｏｇｙ（Ａｕｓｕｂｅｌら、ｅｄｓ．２００１年付録）参照）、及び切片材料の免疫組織学的解析等の免疫測定法、ウェスタンブロット、及び無傷細胞内に到達出来るマーカーに関して、フローサイトメトリー解析（ＦＡＣＳ）（例えば、Ｈａｒｌｏｗ及びＬａｎｅ、Ｕｓｉｎｇ　Ａｎｔｉｂｏｄｉｅｓ：Ａ　Ｌａｂｏｒａｔｏｒｙ　Ｍａｎｕａｌ、ニューヨーク：Ｃｏｌｄ　Ｓｐｒｉｎｇ　Ｈａｒｂｏｒ　Ｌａｂｏｒａｔｏｒｙ　Ｐｒｅｓｓ（１９９８年）参照）が含まれる。
【０２１３】
　例えば、多能性幹細胞の特徴は当業者に周知であり、多能性幹細胞の追加の特徴は、継続して同定されている。例えば、多能性幹細胞マーカーとしては、以下のうちの１つ以上の発現が挙げられる：ＡＢＣＧ２、ｃｒｉｐｔｏ、ＦＯＸＤ３、Ｃｏｎｎｅｘｉｎ４３、Ｃｏｎｎｅｘｉｎ４５、ＯＣＴ４、ＳＯＸ２、Ｎａｎｏｇ、ｈＴＥＲＴ、ＵＴＦ－１、ＺＦＰ４２、ＳＳＥＡ－３、ＳＳＥＡ－４、Ｔｒａ１－６０又はＴｒａ１－８１。
【０２１４】
　多能性幹細胞を本発明の方法で処理した後、処理した細胞集団を、胚体内胚葉系に特徴的なマーカーを発現している細胞により発現される、例えばＣＸＣＲ４等のタンパク質マーカーを特異的に認識する薬剤（例えば、抗体等）に曝露することにより、分化した細胞を精製することができる。
【０２１５】
　膵臓内胚葉系に特徴的なマーカーを発現している細胞の形成
　胚体内胚葉系に特徴的なマーカーを発現している細胞は、当該技術分野の任意の方法、又は本発明で提案する任意の方法により、膵臓内胚葉系に特徴的なマーカーを発現している細胞に分化され得る。
【０２１６】
　例えば、胚体内胚葉系に特徴的なマーカーを発現している細胞は、Ｄ’Ａｍｏｕｒら、Ｎａｔｕｒｅ　Ｂｉｏｔｅｃｈｎｏｌｏｇｙ　２４、１３９２～１４０１（２００６年）に開示されている方法に従って、膵臓内胚葉系に特徴的なマーカーを発現している細胞に分化され得る。
【０２１７】
　例えば、胚体内胚葉系に特徴的なマーカーを発現している細胞は、胚体内胚葉系に特徴的なマーカーを発現している細胞を、線維芽細胞増殖因子及びヘッジホッグシグナル伝達経路阻害剤ＫＡＡＤ－シクロパミンで処理した後、線維芽細胞増殖因子及びＫＡＡＤ－シクロパミンを含有する培地を除去し、続いて細胞をレチノイン酸、線維芽細胞増殖因子及びＫＡＡＤ－シクロパミンを含有する培地中で培養することにより、膵臓内胚葉系に特徴的なマーカーを発現している細胞に更に分化させられる。この方法の例は、Ｎａｔｕｒｅ　Ｂｉｏｔｅｃｈｎｏｌｏｇｙ　２４、１３９２～１４０１（２００６年）に開示されて

いる。

【０２１８】

本発明の一態様では、ＬｉｆｅＳｃａｎ，Ｉｎｃ．に譲渡された米国特許出願第１１／７３６，９０８号に従って、胚体内胚葉系に特徴的なマーカーを発現する細胞をレチノイン酸及び少なくとも１種類の線維芽細胞増殖因子で所定の時間処理することによって、胚体内胚葉系に特徴的なマーカーを発現する細胞を膵臓内胚葉系に特徴的なマーカーを発現する細胞に更に分化させる。

【０２１９】

本発明の一態様では、ＬｉｆｅＳｃａｎ，Ｉｎｃ．に譲渡された米国特許出願第１１／７７９，３１１号に従って、胚体内胚葉系に特徴的なマーカーを発現する細胞をレチノイン酸及び少なくとも１種類の線維芽細胞増殖因子で所定の時間処理することによって、胚体内胚葉系に特徴的なマーカーを発現する細胞を膵臓内胚葉系に特徴的なマーカーを発現する細胞に更に分化させる。

【０２２０】

本発明の１つの態様では、胚体内胚葉系に特徴的なマーカーを発現している細胞を米国特許出願第６０／９９０，５２９号に記載の方法に従って処理することにより、膵臓内胚葉系に特徴的なマーカーを発現している細胞へと胚体内胚葉系に特徴的なマーカーを発現している細胞を更に分化させる。

【０２２１】

胚体内胚葉系に特徴的なマーカーを発現している細胞は、膵臓内胚葉系に特徴的なマーカーを発現している細胞の形成を促進させ得る少なくとも１つの他の追加の因子で処理されてもよい。代替的に、少なくとも１つの他の追加の因子は、本発明の方法により形成された、膵臓内胚葉系に特徴的なマーカーを発現している細胞の増殖を促進させてもよい。更に、少なくとも１つの他の追加の因子は、本発明の方法により形成された膵臓内胚葉系に特徴的なマーカーを発現している細胞の、他の細胞型を形成する能力、又は任意の他の追加の分化工程の効率を改善する能力を向上させてもよい。

【０２２２】

例えば、少なくとも１つの追加の因子は、ニコチンアミド、ＴＧＦ－β１、２及び３を含むＴＧＦ－βファミリーメンバー、血清アルブミン、線維芽細胞増殖因子ファミリー、血小板由来増殖因子ＡＡ及びＢＢ、多血小板血漿、インスリン増殖因子（ＩＧＦ－Ｉ、ＩＩ）、増殖分化因子（例えば、ＧＤＦ－５、－６、－８、－１０、－１１など）、グルカゴン様ペプチドーＩ及びＩＩ（ＧＬＰ－Ｉ及びＩＩ）、ＧＬＰ－１及びＧＬＰ－２ ｍｉｍｅｔｏｂｏｄｙ、エキセンディン－４、レチノイン酸、副甲状腺ホルモン、インスリン、プロゲステロン、アプロチニン、ハイドロコルチゾン、エタノールアミン、βメルカプトエタノール、上皮成長因子（ＥＧＦ）、ガストリンＩ及びＩＩ、例えばトリエチレンペンタミンなどの銅キレート化剤、フォルスコリン、Ｎａ－酪酸、アクチビン、βセルリン、ＩＴＳ、ノギン、神経突起伸長因子、ｎｏｄａｌ、バルプロ酸、トリコスタチンＡ、酪酸ナトリウム、肝細胞増殖因子（ＨＧＦ）、スフィンゴシン－１、ＶＥＧＦ、ＭＧ１３２（ＥＭＤ，ＣＡ）、Ｎ２及びＢ２７サプリメント類（Ｇｉｂｃｏ，ＣＡ）、例えばシクロパミン（ＥＭＤ，ＣＡ）などのステロイドアルカロイド、ケラチノサイト増殖因子（ＫＧＦ）、Ｄｉｃｋｋｏｐｆタンパク質ファミリー、ウシ下垂体抽出物、膵島新生に関与するタンパク質（ＩＮＧＡＰ）、インディアンヘッジホッグ、ソニックヘッジホッグ、プロテアソーム阻害剤、ノッチ経路阻害剤、ソニックヘッジホッグ阻害剤又はこれらの組み合わせであり得る。

【０２２３】

少なくとも１つの他の追加の因子は、例えば、ＰＡＮＣ－１（ＡＴＣＣ Ｎｏ：ＣＲＬ－１４６９）、ＣＡＰＡＮ－１（ＡＴＣＣ Ｎｏ：ＨＴＢ－７９）、ＢｘＰＣ－３（ＡＴＣＣ Ｎｏ：ＣＲＬ－１６８７）、ＨＰＡＦ－ＩＩ（ＡＴＣＣ Ｎｏ：ＣＲＬ－１９９７）等の膵臓細胞株、例えば、ＨｅｐＧ２（ＡＴＣＣ Ｎｏ：ＨＴＢ－８０６５）等の肝臓細胞株、及び例えば、ＦＨｓ ７４（ＡＴＣＣ Ｎｏ：ＣＣＬ－２４１）等の腸細胞株か

ら得られた条件培地により供給されてもよい。

【０２２４】

膵臓内胚葉系（linage）に特徴的なマーカーを発現している細胞の検出

膵臓内胚葉系に特徴的なマーカーは、当業者に周知であり、膵臓内胚葉系の特徴を示す追加のマーカーが、継続して同定されている。これらのマーカーは、本発明に従って処理された細胞が分化して膵臓内胚葉系の特徴を示す性質を獲得したことを確認するために使用され得る。膵臓内胚葉系に特異的なマーカーには、例えば、Ｈｌｘｂ９、ＰＴＦ－１ａ、ＰＤＸ－１、ＨＮＦ－６、ＨＮＦ－１β等の１つ以上の転写因子の発現を含む。

【０２２５】

分化効率は、膵臓内胚葉系に特徴的なマーカーを発現している細胞により発現されたタンパク質マーカーを特異的に認識する薬剤（例えば、抗体等）に、処理した細胞集団を曝露することにより測定することができる。

【０２２６】

培養又は単離された細胞中のタンパク質及び核酸マーカーの発現を評価する方法は、当該技術分野にて標準的である。これらには、定量的逆転写ポリメラーゼ連鎖反応（ＲＴ－ＰＣR）、ノーザンブロット法、インサイツハイブリダイゼーション（例えば、Ｃｕｒｒｅｎｔ Ｐｒｏｔｏｃｏｌｓ ｉｎ Ｍｏｌｅｃｕｌａｒ Ｂｉｏｌｏｇｙ（Ａｕｓｕｂｅｌら、ｅｄｓ．２００１年付録）参照）、及び切片材料の免疫組織学的解析等の免疫測定法、ウェスタンブロット、及び無傷細胞内に到達出来るマーカーに関して、フローサイトメトリー分析（ＦＡＣＳ）（例えば、Ｈａｒｌｏｗ及びＬａｎｅ、Ｕｓｉｎｇ Ａｎｔｉｂｏｄｉｅｓ：Ａ Ｌａｂｏｒａｔｏｒｙ Ｍａｎｕａｌ，Ｎｅｗ Ｙｏｒｋ：Ｃｏｌｄ Ｓｐｒｉｎｇ Ｈａｒｂｏｒ Ｌａｂｏｒａｔｏｒｙ Ｐｒｅｓｓ（１９９８年）参照）が含まれる。

【０２２７】

膵内分泌腺系のマーカーを発現している細胞の形成

膵臓内胚葉系に特徴的なマーカーを発現している細胞は、当該技術分野の任意の方法、又は本発明で提案する任意の方法により、膵内分泌系に特徴的なマーカーを発現している細胞へと分化させることができる。

【０２２８】

例えば、膵臓内胚葉系に特徴的なマーカーを発現している細胞は、Ｄ’Ａｍｏｕｒら、Ｎａｔｕｒｅ Ｂｉｏｔｅｃｈｎｏｌｏｇｙ ２４、１３９２～１４０１（２００６年）に開示されている方法に従って、膵内分泌系に特徴的なマーカーを発現している細胞に分化され得る。

【０２２９】

例えば、膵臓内胚葉系に特徴的なマーカーを発現している細胞は、膵臓内胚葉系に特徴的なマーカーを発現している細胞をＤＡＰＴ及びエキセンディン４を含有する培地中で培養し、次にＤＡＰＴ及びエキセンディン４を含有する培地を除去し、続いて細胞をエキセンディン１、ＩＧＦ－１及びＨＧＦを含有する培地中で培養することにより、膵内分泌系に特徴的なマーカーを発現している細胞へと更に分化する。この方法の例は、Ｎａｔｕｒｅ Ｂｉｏｔｅｃｈｎｏｌｏｇｙ ２４、１３９２～１４０１（２００６年）に開示されている。

【０２３０】

例えば、膵臓内胚葉系に特徴的なマーカーを発現している細胞は、膵臓内胚葉系に特徴的なマーカーを発現している細胞をエキセンディン４を含有する培地中で培養し、次にエキセンディン４を含有する培地を除去し、続いて細胞をエキセンディン１、ＩＧＦ－１及びＨＧＦを含有する培地中で培養することにより、膵内分泌系に特徴的なマーカーを発現している細胞へと更に分化する。この方法の例は、Ｄ’Ａｍｏｕｒら、Ｎａｔｕｒｅ Ｂｉｏｔｅｃｈｎｏｌｏｇｙ、２００６年に開示されている。

【０２３１】

例えば、膵臓内胚葉系に特徴的なマーカーを発現している細胞は、膵臓内胚葉系に特徴

的なマーカーを発現している細胞をＤＡＰＴ及びエキセンディン４を含有する培地中で培養することにより、膵内分泌系に特徴的なマーカーを発現している細胞へと更に分化する。この方法の例は、Ｄ’Ａｍｏｕｒら、Ｎａｔｕｒｅ　Ｂｉｏｔｅｃｈｎｏｌｏｇｙ、２００６年に開示されている。

【０２３２】

例えば、膵臓内胚葉系に特徴的なマーカーを発現している細胞は、膵臓内胚葉系に特徴的なマーカーを発現している細胞をエキセンディン４を含有する培地中で培養することにより、膵内分泌系に特徴的なマーカーを発現している細胞へと更に分化する。この方法の例は、Ｄ’Ａｍｏｕｒら、Ｎａｔｕｒｅ　Ｂｉｏｔｅｃｈｎｏｌｏｇｙ、２００６年に開示されている。

【０２３３】

本発明の一態様では、膵臓内胚葉系に特徴的なマーカーを発現している細胞を、ＬｉｆｅＳｃａｎ，Ｉｎｃ．に譲渡された米国特許出願第１１／７３６，９０８号に開示された方法に従って、ノッチシグナル伝達経路を阻害する因子で処理することで、膵臓内胚葉系に特徴的なマーカーを発現している細胞を膵内分泌系に特徴的なマーカーを発現している細胞へと更に分化させる。

【０２３４】

本発明の一態様では、膵臓内胚葉系に特徴的なマーカーを発現している細胞を、ＬｉｆｅＳｃａｎ，Ｉｎｃ．に譲渡された米国特許出願第１１／７７９，３１１号に開示された方法に従って、ノッチシグナル伝達経路を阻害する因子で処理することで、膵臓内胚葉系に特徴的なマーカーを発現している細胞を膵内分泌系に特徴的なマーカーを発現している細胞へと更に分化させる。

【０２３５】

本発明の一態様では、膵臓内胚葉系に特徴的なマーカーを発現している細胞を、ＬｉｆｅＳｃａｎ，Ｉｎｃ．に譲渡された米国特許出願第６０／９５３，１７８号に開示された方法に従って、ノッチシグナル伝達経路を阻害する因子で処理することで、膵臓内胚葉系に特徴的なマーカーを発現している細胞を膵内分泌系に特徴的なマーカーを発現している細胞へと更に分化させる。

【０２３６】

本発明の一態様では、膵臓内胚葉系に特徴的なマーカーを発現している細胞を、米国特許出願第６０／９９０，５２９号に開示された方法に従って処理することで、膵臓内胚葉系に特徴的なマーカーを発現している細胞を膵内分泌系に特徴的なマーカーを発現している細胞へと更に分化させる。

【０２３７】

膵臓内胚葉系に特徴的なマーカーを発現している細胞を、膵内分泌系に特徴的なマーカーを発現している細胞の形成を促進させ得る、少なくとも１つの他の追加の因子で処理してもよい。代替的に、少なくとも１つの他の追加の因子は、本発明の方法により形成された、膵内分泌系に特徴的なマーカーを発現している細胞の増殖を促進させてもよい。更に、この少なくとも１種類の更なる他の因子は、本発明の方法によって形成される、膵内分泌系に特徴的なマーカーを発現する細胞の、他の細胞種を形成する能力を増強するものであってもよく、あるいは他の任意の更なる分化段階の効率を高めるものであってもよい。

【０２３８】

少なくとも１つの追加の因子は、例えば、ニコチンアミド、ＴＧＦ－β１、２、及び３を含むＴＧＦ－βファミリーのメンバー、血清アルブミン、線維芽細胞増殖因子ファミリーのメンバー、血小板由来増殖因子ＡＡ及びＢＢ、多血小板血漿、インスリン増殖因子（ＩＧＦ－Ｉ、ＩＩ）、増殖分化因子（例えば、ＧＤＦ－５、－６、－８、－１０、－１１など）、グルカゴン様ペプチドーＩ及びＩＩ（ＧＬＰ－Ｉ及びＩＩ）、ＧＬＰ－１及びＧＬＰ－２　ｍｉｍｅｔｏｂｏｄｙ、エキセンディン４、レチノイン酸、副甲状腺ホルモン、インスリン、プロゲステロン、アプロチニン、ヒドロコルチゾン、エタノールアミン、βメルカプトエタノール、上皮増殖因子（ＥＧＦ）、ガストリンＩ及びＩＩ、例えばトリ

エチレンペンタミン等の銅キレーター、フォルスコリン、酪酸Ｎａ、アクチビン、ベータセルリン、ＩＴＳ、ノギン、神経突起増殖因子、ｎｏｄａｌ、バルプロ酸、トリコスタチンＡ、酪酸ナトリウム、肝細胞増殖因子（ＨＧＦ）、スフィンゴシン－１、ＶＥＧＦ、ＭＧ１３２（ＥＭＤ，ＣＡ）、Ｎ２及びＢ２７サプリメント（Ｇｉｂｃｏ，ＣＡ）、例えばシクロパミン（ＥＭＤ，ＣＡ）等のステロイドアルカロイド、ケラチノサイト増殖因子（ＫＧＦ）、Ｄｉｃｋｋｏｐｆタンパク質ファミリー、ウシ下垂体抽出物、膵島新生に関連したタンパク質（ＩＮＧＡＰ）、インディアンヘッジホッグ、ソニックヘッジホッグ、プロテアソーム阻害剤、ノッチ経路阻害剤、ソニックヘッジホッグ阻害剤、又はそれらの組み合わせであってもよい。

【０２３９】

少なくとも１つの他の追加の因子は、例えば、ＰＡＮＣ－１（ＡＴＣＣ Ｎｏ：ＣＲＬ－１４６９）、ＣＡＰＡＮ－１（ＡＴＣＣ Ｎｏ：ＨＴＢ－７９）、ＢｘＰＣ－３（ＡＴＣＣ Ｎｏ：ＣＲＬ－１６８７）、ＨＰＡＦ－ＩＩ（ＡＴＣＣ Ｎｏ：ＣＲＬ－１９９７）等の膵臓細胞株、例えば、ＨｅｐＧ２（ＡＴＣＣ Ｎｏ：ＨＴＢ－８０６５）等の肝臓細胞株、及び例えば、ＦＨｓ ７４（ＡＴＣＣ Ｎｏ：ＣＣＬ－２４１）等の腸細胞株から得られた条件培地により供給されてもよい。

【０２４０】

膵内分泌系（linage）に特徴的なマーカーを発現している細胞の検出

膵内分泌系に特徴的なマーカーは当業者に周知であり、膵内分泌系の特徴を示す追加のマーカーが継続して同定されている。これらのマーカーは、本発明に従って処理された細胞が分化して膵内分泌系の特徴を示す性質を獲得したことを確認するために使用され得る。膵内分泌系に特異的なマーカーとしては、例えばＮＧＮ３、ＮＥＵＲＯ又はＩＳＬ１等の転写因子の１種以上の発現が挙げられる。

【０２４１】

β細胞系の細胞に特徴的なマーカーは当業者に周知であり、β細胞系の細胞の特徴を示す追加のマーカーが継続して同定されている。これらのマーカーは、本発明に従って処理された細胞が分化して、β－細胞系の特徴を示す性質を獲得したことを確認するために使用することができる。β細胞系に特異的な特徴としては、例えば、特にＰＤＸ１、ＮＫＸ２．２、ＮＫＸ６．１、ＩＳＬ１、ＰＡＸ６、ＰＡＸ４、ＮＥＵＲＯＤ、ＨＮＦ１β、ＨＮＦ６、ＨＮＦ３β又はＭＡＦＡ等の転写因子の１つ以上の発現が挙げられる。これらの転写因子は、内分泌細胞の同定について当該技術分野で十分に確立されている。例えば、Ｅｄｌｕｎｄ（Ｎａｔｕｒｅ Ｒｅｖｉｅｗｓ ｇｅｎｅｔｉｃｓ ３：５２４～６３２（２００２年））を参照されたい。

【０２４２】

分化効率は、膵内分泌系に特徴的なマーカーを発現している細胞により発現されたタンパク質マーカーを特異的に認識する薬剤（例えば、抗体等）に、被処理細胞集団を曝露することにより測定することができる。あるいは分化効率は、β細胞系に特徴的なマーカーを発現している細胞により発現されたタンパク質マーカーを特異的に認識する薬剤（例えば、抗体等）に、被処理細胞集団を曝露することにより測定することができる。

【０２４３】

培養又は単離された細胞中のタンパク質及び核酸マーカーの発現を評価する方法は、当該技術分野において標準技術である。これらには、定量的逆転写ポリメラーゼ連鎖反応（ＲＴ－ＰＣＲ）、ノーザンブロット法、インサイツハイブリダイゼーション（例えば、Ｃｕｒｒｅｎｔ Ｐｒｏｔｏｃｏｌｓ ｉｎ Ｍｏｌｅｃｕｌａｒ Ｂｉｏｌｏｇｙ（Ａｕｓｕｂｅｌら、ｅｄｓ．２００１年付録）参照）、及び切片材料の免疫組織学的解析等の免疫測定法、ウェスタンブロット、及び無傷細胞内に到達出来るマーカーに関して、フローサイトメトリー分析（ＦＡＣＳ）（例えば、Ｈａｒｌｏｗ及びＬａｎｅ、Ｕｓｉｎｇ Ａｎｔｉｂｏｄｉｅｓ：Ａ Ｌａｂｏｒａｔｏｒｙ Ｍａｎｕａｌ，Ｎｅｗ Ｙｏｒｋ：Ｃｏｌｄ Ｓｐｒｉｎｇ Ｈａｒｂｏｒ Ｌａｂｏｒａｔｏｒｙ Ｐｒｅｓｓ（１９９８年）参照）が含まれる。

【０２４４】

本発明の一態様では、分化効率は、処理後の所定の細胞培養物中のインスリン陽性細胞の百分率を測定することによって求められる。一実施形態では、本発明の方法は、所定の培養物中で約１００％のインスリン陽性細胞を生成する。別の実施形態では、本発明の方法は、所定の培養物中で約９０％のインスリン陽性細胞を生成する。別の実施形態では、本発明の方法は、所定の培養物中で約８０％のインスリン陽性細胞を生成する。別の実施形態では、本発明の方法は、所定の培養物中で約７０％のインスリン陽性細胞を生成する。別の実施形態では、本発明の方法は、所定の培養物中で約６０％のインスリン陽性細胞を生成する。別の実施形態では、本発明の方法は、所定の培養物中で約５０％のインスリン陽性細胞を生成する。別の実施形態では、本発明の方法は、所定の培養物中で約４０％のインスリン陽性細胞を生成する。別の実施形態では、本発明の方法は、所定の培養物中で約３０％のインスリン陽性細胞を生成する。別の実施形態では、本発明の方法は、所定の培養物中で約２０％のインスリン陽性細胞を生成する。別の実施形態では、本発明の方法は、所定の培養物中で約１０％のインスリン陽性細胞を生成する。別の実施形態では、本発明の方法は、所定の培養物中で約５％のインスリン陽性細胞を生成する。

【０２４５】

本発明の一態様では、分化効率は、グルコース刺激によるインスリン分泌を、細胞が放出するＣ－ペプチドの量を測定することで検出し、測定することにより求められる。一実施形態では、本発明の方法により生成される細胞は、ＤＮＡ　１ｐｇ当たり約１０００ｎｇのＣ－ペプチドを産生する。別の実施形態では、本発明の方法により生成される細胞は、ＤＮＡ　１ｐｇ当たり約９００ｎｇのＣ－ペプチドを産生する。別の実施形態では、本発明の方法により生成される細胞は、ＤＮＡ　１ｐｇ当たり約８００ｎｇのＣ－ペプチドを産生する。別の実施形態では、本発明の方法により生成される細胞は、ＤＮＡ　１ｐｇ当たり約７００ｎｇのＣ－ペプチドを産生する。別の実施形態では、本発明の方法により生成される細胞は、ＤＮＡ　１ｐｇ当たり約６００ｎｇのＣ－ペプチドを産生する。別の実施形態では、本発明の方法により生成される細胞は、ＤＮＡ　１ｐｇ当たり約５００ｎｇのＣ－ペプチドを産生する。別の実施形態では、本発明の方法により生成される細胞は、ＤＮＡ　１ｐｇ当たり約４００ｎｇのＣ－ペプチドを産生する。別の実施形態では、本発明の方法により生成される細胞は、ＤＮＡ　１ｐｇ当たり約５００ｎｇのＣ－ペプチドを産生する。別の実施形態では、本発明の方法により生成される細胞は、ＤＮＡ　１ｐｇ当たり約４００ｎｇのＣ－ペプチドを産生する。別の実施形態では、本発明の方法により生成される細胞は、ＤＮＡ　１ｐｇ当たり約３００ｎｇのＣ－ペプチドを産生する。別の実施形態では、本発明の方法により生成される細胞は、ＤＮＡ　１ｐｇ当たり約２００ｎｇのＣ－ペプチドを産生する。別の実施形態では、本発明の方法により生成される細胞は、ＤＮＡ　１ｐｇ当たり約１００ｎｇのＣ－ペプチドを産生する。別の実施形態では、本発明の方法により生成される細胞は、ＤＮＡ　１ｐｇ当たり約９０ｎｇのＣ－ペプチドを産生する。別の実施形態では、本発明の方法により生成される細胞は、ＤＮＡ　１ｐｇ当たり約８０ｎｇのＣ－ペプチドを産生する。別の実施形態では、本発明の方法により生成される細胞は、ＤＮＡ　１ｐｇ当たり約７０ｎｇのＣ－ペプチドを産生する。別の実施形態では、本発明の方法により生成される細胞は、ＤＮＡ　１ｐｇ当たり約６０ｎｇのＣ－ペプチドを産生する。別の実施形態では、本発明の方法により生成される細胞は、ＤＮＡ　１ｐｇ当たり約５０ｎｇのＣ－ペプチドを産生する。別の実施形態では、本発明の方法により生成される細胞は、ＤＮＡ　１ｐｇ当たり約４０ｎｇのＣ－ペプチドを産生する。別の実施形態では、本発明の方法により生成される細胞は、ＤＮＡ　１ｐｇ当たり約３０ｎｇのＣ－ペプチドを産生する。別の実施形態では、本発明の方法により生成される細胞は、ＤＮＡ　１ｐｇ当たり約２０ｎｇのＣ－ペプチドを産生する。別の実施形態では、本発明の方法により生成される細胞は、ＤＮＡ　１ｐｇ当たり約１０ｎｇのＣ－ペプチドを産生する。

【０２４６】

治療

一態様では、本発明は、１型糖尿病に罹患しているかあるいは１型糖尿病を発症するリスクを有する患者を治療する方法を提供する。本方法は、多能性幹細胞を培養し、多能性幹細胞をインビトロでβ細胞系に分化させ、β細胞系の細胞を患者に移植することを含む。

【０２４７】

更に別の態様においては、本発明は、２型糖尿病に罹患しているかあるいは２型糖尿病を発症するリスクを有する患者を治療する方法を提供する。本方法は、多能性幹細胞を培養し、培養した多能性幹細胞をインビトロでβ細胞系に分化させ、β細胞系の細胞を患者に埋め込むことを含む。

【０２４８】

適切であるならば、移植した細胞の生存及び機能を亢進する医薬品又は生理活性物質で患者を更に処置してもよい。これらの薬剤は、例えば特に、インスリン、ＴＧＦ－β１、２、及び３を含むＴＧＦ－βファミリーのメンバー、骨形成タンパク質（ＢＭＰ－２、－３、－４、－５、－６、－７、－１１、－１２、及び－１３）、線維芽細胞増殖因子１及び２、血小板由来増殖因子ＡＡ及びＢＢ、多血小板血漿、インスリン増殖因子（ＩＧＦ－Ｉ、ＩＩ）、増殖分化因子（例えば、ＧＤＦ－５、－６、－７、－８、－１０、－１５など）、血管内皮由来増殖因子（ＶＥＧＦ）、プレイオトロフィン、エンドセリンを含んでもよい。他の医薬化合物としては、例えば、ニコチンアミド、グルカゴン様ペプチド－Ｉ（ＧＬＰ－１）及びＩＩ、ＧＬＰ－１及び２疑似体、エキセンディン４、レチノイン酸、副甲状腺ホルモン、ＭＡＰＫ阻害剤、例えば、米国特許出願公開第２００４／０２０９９０１号及び同第２００４／０１３２７２９号に開示されている化合物等の化合物が挙げられる。

【０２４９】

多能性幹細胞は、レシピエントに移植する前にインスリン産生細胞に分化させてもよい。具体的な実施形態では、多能性幹細胞は、レシピエントに移植する前にβ細胞へと完全に分化させる。あるいは多能性幹細胞は、未分化又は一部が分化した状態でレシピエントに移植してもよい。更なる分化はレシピエント内で行われ得る。

【０２５０】

胚体内胚葉細胞、又は代替的には膵臓内胚葉細胞、又は代替的にはβ細胞を、分散した細胞として埋め込んでもよく、又は肝門静脈内に注入され得るクラスターとして編成してもよい。あるいは細胞は、生体適合性の分解性ポリマー支持体、多孔性の非分解性デバイス内に提供されてもよく、又は宿主免疫応答から保護されるよう封入されてもよい。細胞は、レシピエント内の適切な部位内に埋め込まれてもよい。埋め込み部位としては、例えば肝臓、天然の膵臓、腎被膜下空間、網、腹膜、漿膜下空間、腸、胃、又は皮下ポケットが挙げられる。

【０２５１】

埋め込まれた細胞の更なる分化、生存又は活性を向上するために、増殖因子、抗酸化剤又は抗炎症剤等の追加の因子を、細胞の投与前に、投与と同時に、又は投与後に投与してもよい。所定の実施形態において、増殖因子は、インビボで、投与された細胞を分化させるよう使用される。これらの因子は、内在性細胞により分泌され、投与された細胞にその場で（in situ）で曝露されてもよい。埋め込まれた細胞には、当該技術分野で公知の内因性の及び外因性の増殖因子の任意の組み合わせにより、分化を誘発させることもできる。

【０２５２】

埋め込みに使用する細胞の量は、患者の状態及び治療に対する応答を含む、多数の様々な要因に基づいて当業者により決定され得る。

【０２５３】

一態様では、本発明は糖尿病に罹患しているかあるいは糖尿病を発症するリスクを有する患者を治療する方法を提供する。本方法は、多能性幹細胞を培養し、培養した多能性幹細胞をインビトロでβ細胞系に分化させ、このβ細胞系を３次元支持体に埋め込むことを

含む。細胞は、患者に埋め込む前に、インビトロでこの支持体上に維持してもよい。あるいは細胞を含む支持体を、インビトロで更に培養することなく直接患者に埋め込んでもよい。支持体は、場合により、埋め込まれた細胞の生存及び機能を亢進する少なくとも１つの医薬品を組み込んでもよい。

【０２５４】

本発明の目的のために使用するのに好適な支持体材料は、組織修復に有用な組織鋳型、導管、バリア及び貯蔵所を含む。より詳細には、発泡体、スポンジ、ゲル、ヒドロゲル、織物、及び不織構造の形態を有する合成及び天然材料であって、インビトロ及びインビボで使用されて、生物組織を再構築又は再生し、また走化性薬剤を送達して組織増殖を誘発する材料が、本発明の方法の実施における使用に適切である。例えば、米国特許第５，７７０，４１７号、米国特許第６，０２２，７４３号、米国特許第５，５６７，６１２号、米国特許第５，７５９，８３０号、米国特許第６，６２６，９５０号、米国特許第６，５３４，０８４号、米国特許第６，３０６，４２４号、米国特許第６，３６５，１４９号、米国特許第６，５９９，３２３号、米国特許第６，６５６，４８８号、米国特許出願公開第２００４／００６２７５３Ａ１号、米国特許第４，５５７，２６４号及び米国特許第６，３３３，０２９号に開示されている材料を参照されたい。

【０２５５】

支持体を形成するのに先立ち、薬剤をポリマー溶液と混合することで、医薬品が組み込まれた支持体を形成することもできる。あるいは加工された支持体上に、医薬品を好ましくは医薬担体の存在下で被覆してもよい。医薬品は、液体、超微粒子状固体、又は任意の他の適切な物理的形態として存在し得る。あるいは医薬品の放出速度を変更するために、支持体に賦形剤を加えてもよい。別の実施形態では、抗炎症性化合物である少なくとも１種の医薬化合物、例えば米国特許第６，５０９，３６９号に開示される化合物を支持体に組み込む。

【０２５６】

支持体には、抗アポトーシス化合物である少なくとも１種の医薬化合物、例えば米国特許第６，７９３，９４５号に開示されている化合物を組み込んでもよい。

【０２５７】

支持体には、線維症阻害剤である少なくとも１種の医薬化合物、例えば米国特許第６，３３１，２９８号に開示されている化合物も組み込まれ得る。

【０２５８】

支持体には、血管新生を促進させることができる少なくとも１種の医薬化合物、例えば米国特許出願公開第２００４／０２２０３９３号及び同第２００４／０２０９９０１号に開示されている化合物も組み込まれ得る。

【０２５９】

支持体には、免疫抑制化合物である少なくとも１種の医薬化合物、例えば、米国特許出願公開第２００４／０１７１６２３号に開示されている化合物も組み込まれ得る。

【０２６０】

支持体には、例えば特にＴＧＦ－β１、２、及び３を含むＴＧＦ－βファミリーのメンバー、骨形成タンパク質（ＢＭＰ－２、－３、－４、－５、－６、－７、－１１、－１２、及び－１３）、線維芽細胞増殖因子１及び２、血小板由来増殖因子ＡＡ及びＢＢ、多血小板血漿、インスリン増殖因子（ＩＧＦ－Ｉ、ＩＩ）、増殖分化因子（例えば、ＧＤＦ－５、－６、－７、－８、－１０、－１５など）、血管内皮由来増殖因子（ＶＥＧＦ）、プレイオトロフィン、エンドセリン等の増殖因子である、少なくとも１種の医薬化合物も組み込まれ得る。他の医薬化合物は、例えばニコチンアミド、低酸素誘導因子１－α、グルカゴン様ペプチドーＩ（ＧＬＰ－Ｉ）、ＧＬＰ－１及びＧＬＰ－２疑似体、並びにＩＩ、エキセンディン４、ｎｏｄａｌ、ノギン、ＮＧＦ、レチノイン酸、副甲状腺ホルモン、テネイシンーＣ、トロポエラスチン、トロンビン由来ペプチド、カテリシジン、デフェンシン、ラミニン、フィブロネクチン及びビトロネクチン等の接着性細胞外マトリックスタンパク質の細胞－及びヘパリン－結合ドメインを含む生物ペプチド、例えば米国特許出願公

開第２００４／０２０９９０１号及び米国特許出願公開第２００４／０１３２７２９号に開示されている化合物等のＭＡＰＫ阻害剤を含んでもよい。
【０２６１】
　スキャフォールド内への本発明の細胞の組み込みは、細胞をスキャフォールド上に単に沈着させることにより達成できる。細胞は、単純拡散によりスキャフォールド内に入れることができる（Ｊ．Ｐｅｄｉａｔｒ．Ｓｕｒｇ．２３（１　Ｐｔ　２）：３～９（１９８８年））。細胞播種の効率を向上させるために、いくつかの他の手法が開発されている。例えば、軟骨細胞をポリグリコール酸スキャフォールド上に播種する際に、スピナーフラスコが使用されている（Ｂｉｏｔｅｃｈｎｏｌ．Ｐｒｏｇ．１４（２）：１９３～２０２（１９９８））。細胞播種のための他の手法は遠心法の使用であり、これは播種する細胞に与えるストレスを最小にし、かつ播種効率を高める。例えば、Ｙａｎｇらは、Ｃｅｎｔｒｉｆｕｇａｔｉｏｎａｌ　Ｃｅｌｌ　Ｉｍｍｏｂｉｌｉｚａｔｉｏｎ（ＣＣＩ）と称される細胞播種方法（Ｊ．Ｂｉｏｍｅｄ．Ｍａｔｅｒ．Ｒｅｓ．５５（３）：３７９～８６頁（２００１年））を開発した。
【０２６２】
　以下の実施例により本発明を更に例示するが、本発明はこれらの実施例により限定されるものではない。
【実施例】
【０２６３】
　開示を明確にするために、本発明の詳細な説明を、限定を目的とすることなく、本発明の特定の特徴、実施形態、又は応用を、説明又は図示した以下の小項目に分ける。
【０２６４】
（実施例１）
ヒト胚性幹細胞の培養
　ヒト胚性幹細胞株Ｈ１、Ｈ７、及びＨ９をＷｉＣｅｌｌ　Ｒｅｓｅａｒｃｈ　Ｉｎｓｔｉｔｕｔｅ，Ｉｎｃ．（Ｍａｄｉｓｏｎ，ＷＩ）から得て、供給元の研究所により提供された取扱説明書に従って培養した。また、ｇｒｏｗｔｈ　ｆａｃｔｏｒ－ｒｅｄｕｃｅｄ　ＭＡＴＲＩＧＥＬ（商標）（ＢＤ　Ｂｉｏｓｃｉｅｎｃｅｓ；Ｃａｔ　＃　３５６２３１）を１：３０希釈してコートしたプレート上にヒト胚性幹細胞を播種し、８ｎｇ／ｍＬのｂＦＧＦ（Ｒ＆Ｄ　Ｓｙｓｔｅｍｓ；Ｃａｔ　＃　２３３－ＦＢ）を添加したＭＥＦ馴化培地中で培養した。ＭＡＴＲＩＧＥＬ（商標）上で培養した細胞は、コラゲナーゼＩＶ（Ｉｎｖｉｔｒｏｇｅｎ／ＧＩＢＣＯ；Ｃａｔ　＃　１７１０４－０１９）、ディスパーゼ（Ｉｎｖｉｔｒｏｇｅｎ；Ｃａｔ　＃　１７１０５－０４１）又はリベラーゼＣＩ酵素（Ｒｏｃｈｅ；Ｃａｔ　＃　１１８１４４３５００１）を用いてクラスターとしてルーチン的に継代した。場合によっては細胞はＡＣＣＵＴＡＳＥ（Ｓｉｇｍａ；Ｃａｔ　＃　Ａ６９６４）を用いて単細胞として継代した。
【０２６５】
　これらの実施例で使用したヒト胚性幹細胞は、平均して４日ごとに継代して、未分化な多能性状態に維持した。継代は、細胞培養物をコラゲナーゼ溶液（１又は１０ｍｇ／ｍＬ；Ｓｉｇｍａ－Ａｌｄｒｉｃｈ）に３７℃で１０～３０分間曝露して、続いてピペットチップで穏やかにかき取り、細胞クラスターを回収することにより実施した。クラスターは重力により沈降させ、洗浄して残留コラゲナーゼを除去した。細胞クラスターは、ルーチン的な維持培養については１：３比で、あるいはその後のアッセイについては１：１比で継代した。全てのヒトＥＳ細胞株は５０未満の継代数で維持し、正常な核表現型について及びマイコプラズマ汚染の非存在について、ルーチン的に評価した。
【０２６６】
（実施例２）
胚体内胚葉系に特徴的なマーカーを発現している細胞の形成についてのバイオアッセイ
　アクチビンＡは、胚体内胚葉への胚性幹細胞の分化も含む、広範な細胞型における分化の重要なメディエーターである。アクチビンＡとＷｎｔ３ａとの混合物でヒト胚性幹細胞

を処理した場合、胚体内胚葉に代表的な様々な遺伝子の発現が増加する。このヒト胚性幹細胞の分化を測定するバイオアッセイは、スクリーニングのために９６ウェルプレートへと小型化させたフォーマットに適応させた。検証は、市販のアクチビンＡ組み換えタンパク質及びＷｎｔ３ａ組み換えタンパク質で処理し、胚体内胚葉の代表的なマーカーであると考えられる転写因子ＳＯＸ１７のタンパク質発現を測定することで実施した。

【０２６７】

細胞生存率アッセイ：簡潔に述べると、Ｈ１ヒト胚性幹細胞のクラスターを、ｇｒｏｗｔｈ ｆａｃｔｏｒ－ｒｅｄｕｃｅｄ ＭＡＴＲＩＧＥＬ（商標）（Ｉｎｖｉｔｒｏｇｅｎ；Ｃａｔ ＃ ３５６２３１）をコートした組織培養プラスチック上で増殖させた。細胞を、コラゲナーゼ（Ｉｎｖｉｔｒｏｇｅｎ；Ｃａｔ ＃ １７１０４－０１９）処理及び穏やかな掻爬により継代し、洗浄して残留酵素を除去し、ｇｒｏｗｔｈ ｆａｃｔｏｒ－ｒｅｄｕｃｅｄ ＭＡＴＲＩＧＥＬ（商標）をコートした９６ウェルブラックプレート（Ｐａｃｋａｒｄ ＶｉｅｗＰｌａｔｅｓ；Ｐｅｒｋｉｎ Ｅｌｍｅｒ；Ｃａｔ ＃ ６００５１８２）上に１：１（表面積）比で蒔いた。細胞をクラスター様に付着させ、次いで８ｎｇ／ｍＬのｂＦＧＦ（Ｒ＆Ｄ Ｓｙｓｔｅｍｓ；Ｃａｔ ＃ ２３３－ＦＢ）を添加したマウス胚性線維芽細胞（ＭＥＦ）馴化培地を毎日１ウェルあたり１００μＬ供給しながら１～３日経過させ、対数増殖期を回復させた。

【０２６８】

アッセイは、各プレートのウェルをＰＢＳ（Ｉｎｖｉｔｒｏｇｅｎ；Ｃａｔ ＃ １４１９０）で２回洗浄することにより開始し、続いて、試験サンプルを含有しているＤＭＥＭ：Ｆ１２基本培地（Ｉｎｖｉｔｒｏｇｅｎ；Ｃａｔ ＃ １１３３０－０３２）のアリコート（１００μＬ）を各ウェルへと加えた。試験サンプルを含む各ウェルから一日おきに培地を吸引し及び交換して培地を供給しながら、三つ組複製で、全部で４日間のアッセイ期間にわたる試験条件を実施した。アッセイの初日及び二日目では、試験サンプルは０．５％ ＦＣＳ（ＨｙＣｌｏｎｅ；Ｃａｔ ＃ ＳＨ３００７０．０３）と２０ｎｇ／ｍＬのＷｎｔ３ａ（Ｒ＆Ｄ Ｓｙｓｔｅｍｓ；Ｃａｔ ＃ １３２４－ＷＮ）とを含有するＤＭＥＭ：Ｆ１２に希釈してアッセイウェルに加えた。アッセイの三日目及び四日目では、アッセイウェルに加える試験サンプルは、２％ ＦＣＳは含有するがＷｎｔ３ａは不含のＤＭＥＭ：Ｆ１２に希釈した。ヒト組換えアクチビンＡ（ＰｅｐｒｏＴｅｃｈ；Ｃａｔ ＃ １２０－１４）からなる陽性対照サンプルを、１日目と２日目にはＷｎｔ３ａ（２０ｎｇ／ｍＬ）を加えて、アッセイを通して１００ｎｇ／ｍＬの濃度で加えた。陰性対照サンプルでは、アクチビンＡ及びＷｎｔ３ａのどちらの処理も省いた。

【０２６９】

ハイコンテンツな解析：４日間の培養の最後に、アッセイプレートをＰＢＳ（Ｉｎｖｉｔｒｏｇｅｎ；Ｃａｔ ＃ １４１９０）で２回洗浄し、４％パラホルムアルデヒド（Ａｌｅｘｉｓ Ｂｉｏｃｈｅｍｉｃａｌ；Ｃａｔ ＃ ＡＬＸ－３５０－０１１）で室温で２０分間にわたって固定し、次いでＰＢＳで３回洗浄し、０．５％ Ｔｒｉｔｏｎ Ｘ－１００（Ｓｉｇｍａ；Ｃａｔ ＃ Ｔ８７６０－２）で室温で２０分間にわたって透過処理した。細胞を再度ＰＢＳで３回洗浄し、４％ニワトリ血清（Ｉｎｖｉｔｒｏｇｅｎ；Ｃａｔ ＃ １６１１００８２）のＰＢＳ溶液で、室温で３０分間にわたってブロッキング処理した。一次抗体（ヤギ抗ヒトＳＯＸ１７；Ｒ＆Ｄ Ｓｙｓｔｅｍｓ；Ｃａｔ ＃ ＡＦ１９２４）を４％ニワトリ血清に１：１００で希釈し、室温で１時間各ウェルに加えた。Ａｌｅｘａ Ｆｌｕｏｒ ４８８を結合させた二次抗体（ニワトリ抗ヤギＩｇＧ；Ｍｏｌｅｃｕｌａｒ Ｐｒｏｂｅｓ；Ｃａｔ ＃ ＡＺ１４６７）をＰＢＳに１：２００で希釈し、ＰＢＳで３回洗浄したあとの各サンプルウェルに加えた。核を対比染色するために、４μｇ／ｍＬ Ｈｏｅｃｈｓｔ ３３３４２（Ｉｎｖｉｔｒｏｇｅｎ；Ｃａｔ ＃ Ｈ３５７０）を室温で１０分間にわたって添加した。プレートをＰＢＳで１回洗浄し、撮像のために１００μＬ／ウェルのＰＢＳで残した。

【０２７０】

Ｈｏｅｃｈｓｔ ３３３４２とＡｌｅｘａ Ｆｌｕｏｒ ４８８とで染色した細胞用に

５１００８ｂｓダイクロイックを利用して、ＩＮ　Ｃｅｌｌ　Ａｎａｌｙｚｅｒ　１０００（ＧＥ　Ｈｅａｌｔｈｃａｒｅ）を用いて撮像を実施した。曝露時間は陽性対照ウェル及び二次抗体単独で染色した未処理陰性対照ウェルから最適化した。１ウェルあたり１５視野の撮像を得て、バイオアッセイ及び続く染色手順の間の任意の細胞ロスを補正した。ＩＮ　Ｃｅｌｌ　Ｄｅｖｅｌｏｐｅｒ　Ｔｏｏｌｂｏｘ　１．７（ＧＥ　Ｈｅａｌｔｈｃａｒｅ）ソフトウェアを用いて総細胞数及び総ＳＯＸ１７強度についての測定値を各ウェルから得た。核の分裂は、グレースケールレベル（ベースライン範囲１００～３００）と核の大きさに基づいて判定した。各複製データセットについて平均及び標準偏差を算出した。総ＳＯＸ１７タンパク質発現は、細胞面積によって乗じた細胞の総蛍光値として定義される総強度又は積分強度として記録した。バックグラウンドは、２００～３５００の間のグレースケール範囲の許容基準に基づいて除去した。総強度データは、各ウェルについての総強度を陽性対照についての平均総強度で除することにより正規化した。各複製セットについて、平均及び標準偏差用に正規化データを算出した。

【０２７１】

図１は、アクチビンＡの市販品（ＰｅｐｒｏＴｅｃｈ）の２倍段階希釈曲線を試験し、細胞数（図１Ａ）とＳＯＸ１７強度（図１Ｂ）の両方を測定したスクリーニングアッセイについての検証を示す。ＳＯＸ１７発現誘導についてのアクチビンＡの最適な効果は、概して１００～２００ｎｇ／ｍＬの範囲で観察され、$ＥＣ_{50}$は３０～５０ｎｇ／ｍＬの範囲であった。アッセイの１日目と２日目の処理からＷｎｔ３ａを除去すると、測定可能なＳＯＸ１７発現（図１Ｂ、白色バー）を生じさせることはできなかった。アクチビンＡの非存在も同様に、ＳＯＸ１７発現を生じさせることはできなかった（図１Ｂ）。

【０２７２】

（実施例３）

一次スクリーニング：アクチビンＡ非存在下での、胚体内胚葉系に特徴的なマーカーを発現している細胞へのヒト胚性幹細胞の分化に対する、本発明の化合物の効果

胚体内胚葉系に特徴的なマーカーを発現している細胞への多能性幹細胞の分化は、一連の受容体－リガンド相互作用と、それに続く、最終的に特異的な標的遺伝子の発現を制御するような下流基質のリン酸化と核転写とを導く受容体キナーゼの活性化によって媒介される。一部の細胞型では、これらのシグナルカスケードの最適な活性化には、対立するデフォルト経路に対する阻害を必要とする場合がある。他の場合では、より大きなキナーゼファミリーの代替的なメンバーを含む重複する経路は、部分的に１つ以上のシグナル分子の代わりとなる場合がある。他の場合では、カノニカル及び非カノニカル経路は異なる開始刺激により分岐し得る一方、同様の機能的結果をもたらす場合がある。

【０２７３】

細胞に基づく機能スクリーニングは新規の標的を同定するための１つのアプローチであり、かつ特異的な細胞応答に影響を与え得る方法である。１つの非常に強力なアプローチは一連の繰り返しのスクリーニングを含み、それにより、あるスクリーニングからのリード化合物又はヒット化合物が後続のスクリーニングへと組み込まれる。あるいは一連の異なる可変要素をコンビナトリアルなやり方で一体化して（例えば、キナーゼ阻害剤を備えた増殖因子）、細胞分化に対する新規の効果を同定する。この場合、アニリン－ピリジノトリアジン、環式アニリン－ピリジノトリアジン、及びこれらの合成における、中間体、を含む低分子のライブラリは、ヒト胚性幹細胞の胚体内胚葉分化時に重要な特性について試験され、特に低血清下でかつ増殖因子アクチビンＡの非存在下での「最初の」分化工程の終了時に細胞数を保持又は増加させる効果について試験された。

【０２７４】

スクリーニングアッセイ

細胞アッセイ播種：簡潔に述べると、Ｈ１ヒト胚性幹細胞のクラスターを、ｇｒｏｗｔｈ　ｆａｃｔｏｒ－ｒｅｄｕｃｅｄ　ＭＡＴＲＩＧＥＬ（商標）（Ｉｎｖｉｔｒｏｇｅｎ；Ｃａｔ　＃　３５６２３１）をコートした組織培養プラスチック上で増殖させた。細胞を、コラゲナーゼ（Ｉｎｖｉｔｒｏｇｅｎ；Ｃａｔ　＃　１７１０４－０１９）処理及び

穏やかな掻爬により継代し、洗浄して残留酵素を除去し、ｇｒｏｗｔｈ　ｆａｃｔｏｒ－ｒｅｄｕｃｅｄ　ＭＡＴＲＩＧＥＬ（商標）を１００μＬ／ウェル用量使用してコートした９６ウェルブラックプレート（Ｐａｃｋａｒｄ　ＶｉｅｗＰｌａｔｅｓ；Ｐｅｒｋｉｎ　Ｅｌｍｅｒ；Ｃａｔ　＃　６００５１８２）上に均一に分散させて１：１（表面積）比で蒔いた。細胞をクラスター様に付着させ、次いで８ｎｇ／ｍＬのｂＦＧＦ（Ｒ＆Ｄ　Ｓｙｓｔｅｍｓ；Ｃａｔ　＃　２３３－ＦＢ）を添加したＭＥＦ馴化培地を毎日供給しながら１～３日経過させ、対数増殖期を回復させた。アッセイの持続時間の間、プレートは加湿したボックス中に３７℃、５％　CO_2で維持した。

【０２７５】

化合物の調製及びアッセイ：被試験化合物は、５ｍＭ原液として９６ウェルプレートフォーマットで利用できるように作製し、１００％　ＤＭＳＯ（Ｓｉｇｍａ；Ｃａｔ　＃　Ｄ２６５０）中に溶解させて、－８０℃で保存した。ライブラリ化合物は更に、２０％　ＤＭＳＯ含有５０ｍＭ　ＨＥＰＥＳ（Ｉｎｖｉｔｒｏｇｅｎ；Ｃａｔ　＃　１５６３０－０８０）で０．２ｍＭの中間濃度へと希釈して、４℃で保存した。試験条件は３つ組複製で実施し、４日間のアッセイ期間にわたって隔日で培地を供給した。各ウェルから培養培地を吸引し、続いてＰＢＳ（Ｉｎｖｉｔｒｏｇｅｎ；Ｃａｔ　＃　１４１９０）で３回洗浄して残留増殖因子及び血清を除去することで、一次スクリーニングアッセイを開始した。０．５％　ＦＣＳ（ＨｙＣｌｏｎｅ；Ｃａｔ　＃　ＳＨ３００７０．０３）及び２０ｎｇ／ｍＬのＷｎｔ３ａ（Ｒ＆Ｄ　Ｓｙｓｔｅｍｓ；Ｃａｔ　＃　１３２４－ＷＮ）に加えて２．５μＭ試験化合物を添加したＤＭＥＭ：Ｆ１２基本培地（Ｉｎｖｉｔｒｏｇｅｎ；Ｃａｔ　＃　１１３３０－０３２）を、アッセイの初日に１ウェルあたり２００μＬの試験量で加えた。アッセイの３日目には、２％　ＦＣＳに加えて２．５μＭ試験化合物を添加した、Ｗｎｔ３ａは不含のＤＭＥＭ：Ｆ１２基本培地を、１ウェルあたり２００μＬの試験量で加えた。陽性対照サンプルには、ＦＣＳを添加し、試験化合物は１００ｎｇ／ｍＬヒト組換えアクチビンＡ（ＰｅｐｒｏＴｅｃｈ；Ｃａｔ　＃　１２０－１４）に置き換えた同様の基本培地を含有させ、Ｗｎｔ３ａ（２０ｎｇ／ｍＬ）を４日間のアッセイを通して１日目と２日目のみに加えた。陰性対照サンプルには、ＦＣＳを添加したＤＭＥＭ：Ｆ１２基本培地を含有させ、１日目と２日目にはＷｎｔ３ａを加えたが、アクチビンＡは除いた。

【０２７６】

ハイコンテンツな解析：４日間の培養の最後に、アッセイプレートをＰＢＳ（Ｉｎｖｉｔｒｏｇｅｎ；Ｃａｔ　＃　１４１９０）で２回洗浄し、４％パラホルムアルデヒド（Ａｌｅｘｉｓ　Ｂｉｏｃｈｅｍｉｃａｌ；Ｃａｔ　＃　ＡＬＸ－３５０－０１１）で室温で２０分間にわたって固定し、次いでＰＢＳで３回洗浄し、０．５％　Ｔｒｉｔｏｎ　Ｘ－１００（Ｓｉｇｍａ；Ｃａｔ　＃　Ｔ８７６０－２）で室温で２０分間にわたって透過処理した。細胞を再度ＰＢＳで３回洗浄し、４％ニワトリ血清（Ｉｎｖｉｔｒｏｇｅｎ；Ｃａｔ　＃　１６１１００８２）のＰＢＳ溶液で、室温で３０分間にわたってブロッキング処理した。一次抗体（ヤギ抗ヒトＳＯＸ１７；Ｒ＆Ｄ　Ｓｙｓｔｅｍｓ；Ｃａｔ　＃　ＡＦ１９２４）を４％ニワトリ血清に１：１００で希釈し、各ウェルに加え室温で１時間置いた。Ａｌｅｘａ　Ｆｌｕｏｒ　４８８を結合させた二次抗体（ニワトリ抗ヤギＩｇＧ；Ｍｏｌｅｃｕｌａｒ　Ｐｒｏｂｅｓ；Ｃａｔ　＃　ＡＺ１４６７）をＰＢＳに１：２００で希釈し、ＰＢＳで３回洗浄したあとの各サンプルウェルに加えた。核を対比染色するために、４μｇ／ｍＬ　Ｈｏｅｃｈｓｔ　３３３４２（Ｉｎｖｉｔｒｏｇｅｎ；Ｃａｔ　＃　Ｈ３５７０）を室温で１０分間にわたって添加した。プレートをＰＢＳで１回洗浄し、撮像のために１００μＬ／ウェルのＰＢＳで残した。

【０２７７】

Ｈｏｅｃｈｓｔ　３３３４２とＡｌｅｘａ　Ｆｌｕｏｒ　４８８とで染色した細胞用に５１００８ｂｓ　ｄｉｃｈｒｏｉｃを利用して、ＩＮ　Ｃｅｌｌ　Ａｎａｌｙｚｅｒ　１０００（ＧＥ　Ｈｅａｌｔｈｃａｒｅ）を用いて撮像を実施した。曝露時間は陽性対照ウェル及び二次抗体単独で染色した未処理陰性対照ウェルから最適化した。１ウェルあたり

１５視野の撮像を得て、バイオアッセイ及び続く染色手順の間の任意の細胞ロスを補正した。ＩＮ Ｃｅｌｌ Ｄｅｖｅｌｏｐｅｒ Ｔｏｏｌｂｏｘ １．７（ＧＥ Ｈｅａｌｔｈｃａｒｅ）ソフトウェアを用いて総細胞数及び総ＳＯＸ１７強度についての測定値を各ウェルから得た。グレースケールレベル（ベースライン範囲１００～３００）と核の大きさに基づいて判定した。各複製データセットについて平均及び標準偏差を算出した。総ＳＯＸ１７タンパク質発現は、細胞面積によって乗じた細胞の総蛍光値として定義される総強度又は積分強度として記録した。バックグラウンドは、２００～３５００の間のグレースケール範囲の許容基準に基づいて除去した。総強度データは、各ウェルについての総強度を陽性対照についての平均総強度で除することにより正規化した。各複製セットについて、平均及び標準偏差用に正規化データを算出した。

【０２７８】

表１は、被試験化合物の一次スクリーニングの結果を示し、被試験化合物が、アクチビンＡ非存在下で、胚体内胚葉系に特徴的なマーカーを発現している細胞へのヒト胚性幹細胞の分化に対してもたらす効果を示す。結果は細胞数及びＳＯＸ１７強度の両方の定量的尺度を含み、ここで各データ点を、３つ組複製ウェルから平均し、及び各ウェルで同一視野を用いて各パラメータについて解析した。転写因子ＳＯＸ１７の発現は、胚体内胚葉分化の指標になると考えられる。一次スクリーニングの結果は９６ウェルスクリーニングプレートから収集された。プレート間のばらつきは、各プレート上のそれぞれの陽性対照及び陰性対照の含有物に基づいて低減させた。結果は正規化して、陽性対照の百分率として表わす。アッセイ終了時の細胞数の保持又は増幅に注目した。

【０２７９】

表２には、２７種の化合物のサブセットと、一次スクリーニングから得られたそれらの解析結果を記載する。スクリーニングアッセイ中にはアクチビンＡが非存在であるにも関わらず、これらのヒット化合物は細胞数を陽性対照と同レベルで保持するか、あるいは陽性対照よりも良好なレベルを保持するように見えた。

【０２８０】

場合によっては、アクチビンＡの非存在下でＳＯＸ１７発現が誘導された（例えば、環式アニリン－ピリジノトリアジン化合物３５及び化合物２２）。

【０２８１】

表２に示される化合物は、アクチビンＡ非存在下での胚体内胚葉系に特徴的なマーカーを発現している細胞へのヒト胚性幹細胞の分化に対してもたらす効果を更に評価するために選択された。

【０２８２】

（実施例４）

二次スクリーニング：アクチビンＡ非存在下での、ＥＧＦ／ＦＧＦ４による胚体内胚葉系に特徴的なマーカーを発現している細胞へのヒト胚性幹細胞の分化に対する、本発明の化合物の効果

アクチビンＡについての用量設定曲線は、Ｗｎｔ３ａが一定量である場合、ＤＥ分化時に少なくとも２つの効果：１）細胞数の維持又は細胞ロスの防止；と、２）ＤＥマーカー例えば、ＳＯＸ１７発現（実施例２）の誘導と、を示した。実施例３からの一次スクリーニングは、アクチビンＡ／Ｗｎｔ３ａの単独での添加と比較して、アッセイにおいて細胞数を同様に維持するか、あるいは細胞数を改善し得る化合物を同定した。胚体内胚葉の発生に対する、同定された化合物と他の増殖因子、特にＥＧＦ及びＦＧＦ４との組み合わせ効果を評価するために、二次スクリーニングアッセイを実施した。

【０２８３】

細胞アッセイ播種：Ｈ１ヒト胚性幹細胞のクラスターを、ｇｒｏｗｔｈ ｆａｃｔｏｒ－ｒｅｄｕｃｅｄ MATRIGEL（商標）（Ｉｎｖｉｔｒｏｇｅｎ；Ｃａｔ ＃ ３５６２３１）をコートした組織培養プラスチック上で増殖させた。細胞を、コラゲナーゼ（Ｉｎｖｉｔｒｏｇｅｎ；Ｃａｔ ＃ Ｃａｔ ＃ １７１０４－０１９）処理及び穏やかな掻爬により継代し、洗浄して残留酵素を除去し、ｇｒｏｗｔｈ ｆａｃｔｏｒ－ｒｅ

ｄｕｃｅｄ　ＭＡＴＲＩＧＥＬ（商標）を１００μＬ／ウェル用量使用してコートした９６ウェルブラックプレート（Ｐａｃｋａｒｄ　ＶｉｅｗＰｌａｔｅｓ；Ｐｅｒｋｉｎ　Ｅｌｍｅｒ；Ｃａｔ　＃　６００５１８２）上に均一に分散させて１：１（表面積）比で蒔いた。細胞をクラスター様に付着させ、次いで８ｎｇ／ｍＬのｂＦＧＦ（Ｒ＆Ｄ　Ｓｙｓｔｅｍｓ；Ｃａｔ　＃　２３３－ＦＢ）を添加したＭＥＦ馴化培地を毎日供給しながら１～３日経過させ、対数増殖期を回復させた。アッセイの持続時間の間、プレートは加湿したボックス中に３７℃、５％　CO_2で維持した。

【０２８４】

化合物及び増殖因子の調製：ＥＧＦ（Ｒ＆Ｄ　Ｓｙｓｔｅｍｓ；Ｃａｔ　＃　２３６－ＥＧ）及びＦＧＦ４（Ｒ＆Ｄ　Ｓｙｓｔｅｍｓ；Ｃａｔ　＃　２３５－Ｆ４）の原液濃度は２５０ｎｇ／ｍＬであり、それぞれ０．１％　ＢＳＡ（Ｓｉｇｍａ；Ｃａｔ　＃　Ａ７８８８）添加ＰＢＳに溶解させた。化合物は、９６ウェルプレートフォーマットで５ｍＭ原液として利用可能であり、１００％　ＤＭＳＯ（Ｓｉｇｍａ；Ｃａｔ　＃　Ｄ２６５０）中に溶解させて、－８０℃で保存した。化合物は更に、２０％　ＤＭＳＯ含有５０ｍＭ　ＨＥＰＥＳ（Ｉｎｖｉｔｒｏｇｅｎ；Ｃａｔ　＃　１５６３０－０８０）で０．２ｍＭの中間濃度へと希釈して、４℃で保存した。全ての増殖因子及び阻害物質は９６ウェルポリプロピレンプレートのディープウェル中に調製し、アッセイの開始時にＤＭＥＭ：Ｆ１２基本培地で５ｘ中間原液へと希釈し、４℃で保存した。

【０２８５】

３つ組複製で試験し、４日間のアッセイ時間枠にわたって隔日で培地を供給しながら、二次スクリーニングアッセイを実施した。各ウェルから培養培地を吸引し、続いてＰＢＳで３回洗浄して残留増殖因子及び血清を除去することで、アッセイを開始した。０．６２５％　ＦＣＳ（ＨｙＣｌｏｎｅ；Ｃａｔ　＃　ＳＨ３００７０．０３）、２５ｎｇ／ｍＬのＷｎｔ３ａ（Ｒ＆Ｄ　Ｓｙｓｔｅｍｓ）、及び３．１２５μＭ化合物に加えて２０μＬ　５ｘ増殖因子原液を添加したＤＭＥＭ：Ｆ１２基本培地（Ｉｎｖｉｔｒｏｇｅｎ；Ｃａｔ　＃　１１３３０－０３２）を、１ウェルあたり８０μＬの試験量で加え、アッセイにおける最終濃度（０．５％　ＦＣＳ、２０ｎｇ／ｍＬのＷｎｔ３ａ、及び２．５μＭの化合物に加えて５０ｎｇ／ｍＬのＥＧＦ及び５０ｎｇ／ｍＬのＦＧＦ４）を得た。陽性対照ウェル（１００μＬ／ウェル）には、０．５％　ＦＣＳ、２０ｎｇ／ｍＬのＷｎｔ３ａ及び１００ｎｇ／ｍＬのアクチビンＡを添加した同様の基本培地を含有させた。陰性対照ウェル（１００μＬ／ウェル）には、０．５％　ＦＣＳ、２０ｎｇ／ｍＬのＷｎｔ３ａを添加した、アクチビンＡは不含の同様の基本培地を含有させた。

【０２８６】

３日目にウェルを吸引し、２．５％　ＦＣＳ（ＨｙＣｌｏｎｅ）及び３．１２５μＭ化合物に加えて２０μＬ　５ｘ増殖因子原液を添加したＤＭＥＭ：Ｆ１２基本培地を１ウェルあたりに８０μＬ加え、アッセイにおける最終濃度（２％　ＦＣＳ及び２．５μＭの化合物（Ｗｎｔ３ａは不含）に加えて５０ｎｇ／ｍＬのＥＧＦ及びＦＧＦ４）を得た。陽性対照ウェル（１００μＬ／ウェル）には、２％　ＦＣＳ、及び１００ｎｇ／ｍＬのアクチビンＡが添加されＷｎｔ３ａは不含の、同様の基本培地を含有させた。陰性対照ウェル（１００μＬ／ウェル）には、２％　ＦＣＳが添加されアクチビンＡ及びＷｎｔ３ａはどちらも不含の同様の基本培地を含有させた。

【０２８７】

ハイコンテンツな解析：４日間の培養の最後に、アッセイプレートをＰＢＳで２回洗浄し、４％パラホルムアルデヒド（Ａｌｅｘｉｓ　Ｂｉｏｃｈｅｍｉｃａｌ；Ｃａｔ　＃　ＡＬＸ－３５０－０１１）で室温で２０分間にわたって固定し、次いでＰＢＳで３回洗浄し、０．５％　Ｔｒｉｔｏｎ　Ｘ－１００（Ｓｉｇｍａ；Ｃａｔ　＃　Ｔ８７６０－２）で室温で２０分間にわたって透過処理した。細胞を再度ＰＢＳで３回洗浄し、４％ニワトリ血清（Ｉｎｖｉｔｒｏｇｅｎ；Ｃａｔ　＃　１６１１００８２）のＰＢＳ溶液で、室温で３０分間にわたってブロッキング処理した。一次抗体（ヤギ抗ヒトＳＯＸ１７；Ｒ＆Ｄ　Ｓｙｓｔｅｍｓ；Ｃａｔ　＃　ＡＦ１９２４）を４％ニワトリ血清に１：１００で希釈

し、室温で１時間各ウェルに加えた。Ａｌｅｘａ　Ｆｌｕｏｒ　４８８を結合させた二次抗体（ニワトリ抗ヤギＩｇＧ；Ｍｏｌｅｃｕｌａｒ　Ｐｒｏｂｅｓ；Ｃａｔ　＃　ＡＺ１４６７）をＰＢＳに１：２００で希釈し、ＰＢＳで３回洗浄したあとの各サンプルウェルに加えた。核を対比染色するために、４μｇ／ｍＬ　Ｈｏｅｃｈｓｔ　３３３４２（Ｉｎｖｉｔｒｏｇｅｎ；Ｃａｔ　＃　Ｈ３５７０）を室温で１０分間加えた。プレートをＰＢＳで１回洗浄し、撮像のために１００μＬ／ウェルのＰＢＳで残した。

【０２８８】

Ｈｏｅｃｈｓｔ　３３３４２とＡｌｅｘａ　Ｆｌｕｏｒ　４８８とで染色した細胞用に５１００８ｂｓダイクロイックを利用して、ＩＮ　Ｃｅｌｌ　Ａｎａｌｙｚｅｒ　１０００（ＧＥ　Ｈｅａｌｔｈｃａｒｅ）を用いて撮像を実施した。曝露時間は陽性対照ウェル及び二次抗体単独で染色した未処理陰性対照ウェルから最適化した。１ウェルあたり１５視野の撮像を得て、バイオアッセイ及び続く染色手順の間の任意の細胞ロスを補正した。ＩＮ　Ｃｅｌｌ　Ｄｅｖｅｌｏｐｅｒ　Ｔｏｏｌｂｏｘ　１．７（ＧＥ　Ｈｅａｌｔｈｃａｒｅ）ソフトウェアを用いて総細胞数及び総ＳＯＸ１７強度についての測定値を各ウェルから得た。核の分裂は、グレースケールレベル（ベースライン範囲１００～３００）と核の大きさに基づいて判定した。各複製データセットについて平均及び標準偏差を算出した。総ＳＯＸ１７タンパク質発現は、細胞面積によって乗じた細胞の総蛍光値として定義される総強度又は積分強度として記録した。バックグラウンドは、２００～３５００の間のグレースケール範囲の許容基準に基づいて除去した。総強度データは、各ウェルについての総強度を陽性対照についての平均総強度で除することにより正規化した。各複製セットについて、平均及び標準偏差用に正規化データを算出した。

【０２８９】

表３Ａは、アクチビンＡの非存在下での、胚体内胚葉系に特徴的なマーカーを発現している細胞へのヒト胚性幹細胞の分化に対する効果について表２に示されるアニリン－ピリジノトリアジン化合物と組み合わせて試験された、２つの増殖因子、ＥＧＦ及びＦＧＦ４（各５０ｎｇ／ｍＬ）についての試験結果を示す。試験結果は、ＳＯＸ１７発現に対して最も良好な影響を与えるものから順に下降して等級づけしている。ＳＯＸ１７発現に対するこれらの化合物の効果は、アクチビンＡ／Ｗｎｔ３ａ陽性対照と比べて弱いものであると考えられるが、これらの化合物の一部に対する応答は有意なものであると考えられた。例えば、化合物の選択は、恐らくアポトーシスを防止するかあるいは細胞周期を制御するかのいずれかにより、アッセイ時のウェルあたりの細胞数を高水準で保持することに対してユニークな特性を有するように見える。加えて、これらの化合物はＥＧＦ及びＦＧＦ４と協同して、ＳＯＸ１７発現で測定されるように適度に胚体内胚葉分化を促進するように見える。最も効力の強い化合物を表３Ｂ中に列挙した。本アッセイでＥＧＦ及びＦＧＦ４と組み合わせて試験した他の化合物は、ＳＯＸ１７発現誘導に無効であったが、アッセイにおいて細胞数は保持し得るものであった（例えば、化合物９０：細胞数８５％；ＳＯＸ１７発現２％）。

【０２９０】

（実施例５）

アクチビンＡ非存在下での胚体内胚葉系に特徴的なマーカーを発現している細胞へのヒト胚性幹細胞の分化に対する本発明の化合物と他の因子との組み合わせの効果。

【０２９１】

本発明の化合物と、胚体内胚葉分化の制御についての文献から既知である他の増殖因子又は化合物のそれぞれとの組み合わせの効果を評価するために、二次アッセイを実施した。

【０２９２】

細胞アッセイ播種：Ｈ１ヒト胚性幹細胞のクラスターを、ｇｒｏｗｔｈ　ｆａｃｔｏｒ－ｒｅｄｕｃｅｄ　ＭＡＴＲＩＧＥＬ（商標）（Ｉｎｖｉｔｒｏｇｅｎ；Ｃａｔ　＃　３５６２３１）をコートした組織培養プラスチック上で増殖させた。細胞を、コラゲナーゼ（Ｉｎｖｉｔｒｏｇｅｎ；Ｃａｔ　＃　Ｃａｔ　＃　１７１０４－０１９）処理及び穏や

かな掻爬により継代し、洗浄して残留酵素を除去し、ｇｒｏｗｔｈ　ｆａｃｔｏｒ－ｒｅｄｕｃｅｄ　ＭＡＴＲＩＧＥＬ（商標）を１００μＬ／ウェル用量使用してコートした９６ウェルブラックプレート（Ｐａｃｋａｒｄ　ＶｉｅｗＰｌａｔｅｓ；Ｐｅｒｋｉｎ　Ｅｌｍｅｒ；Ｃａｔ　＃　６００５１８２）上に均一に分散させて１：１（表面積）比で蒔いた。細胞をクラスター様に付着させ、次いで８ｎｇ／ｍＬのｂＦＧＦ（Ｒ＆Ｄ　Ｓｙｓｔｅｍｓ；Ｃａｔ　＃　２３３－ＦＢ）を添加したＭＥＦ馴化培地を毎日供給しながら１～３日経過させ、対数増殖期を回復させた。アッセイの持続時間の間、プレートは加湿したボックス中に３７℃、５％　CO_2で維持した。

【０２９３】

化合物及び増殖因子の調製：Ｒ＆Ｄ　Ｓｙｓｔｅｍｓから購入した増殖因子の貯蔵品は、ＥＧＦ（Ｃａｔ　＃２３６－ＥＧ）、ＦＧＦ４（Ｃａｔ　＃２３５－Ｆ４）、ＰＤＧＦ－Ａ（Ｃａｔ　＃２２１－ＡＡ）、ＰＤＧＦ－Ｂ（Ｃａｔ　＃２２０－ＢＢ）、ＰＤＧＦ－Ｃ（Ｃａｔ　＃１６８７－ＣＣ）、ＰＤＧＦ－Ｄ（Ｃａｔ　＃１１５９－ＳＢ）、ＰＤＧＦ－Ａ／Ｂ（Ｃａｔ　＃２２２－ＡＢ）、ＶＥＧＦ（Ｃａｔ　＃２９３－ＶＥ）、ＢＭＰ－１（Ｃａｔ　＃１９２７－ＺＮ）、ＢＭＰ－２（Ｃａｔ　＃３５５－ＢＭ）、ＢＭＰ－４（Ｃａｔ　＃３１４－ＢＰ）、ＢＭＰ－６（Ｃａｔ　＃５０７－ＢＰ）、ＢＭＰ－７（Ｃａｔ　＃２２２－ＡＢ）、ＢＭＰ－２／７（Ｃａｔ　＃３２２９－ＢＭ）であった。試験される他の剤は以下のように購入した：ＢＭＰ－７（Ｓｉｇｍａ；Ｃａｔ　＃　Ｂ１４３４）、ＬＹ２９４００２（Ｃａｙｍａｎ；Ｃａｔ　７０９２０）、ＰＤ９８０５９、Ｕ０１２６、Ｕ０１２４（ＥＭＤ　Ｂｉｏｓｃｉｅｎｃｅｓ；Ｃａｔ　＃　４５３７１０）、ムシモール（Ｔｏｃｒｉｓ；Ｃａｔ　＃　０２８９）、ビククリン（biuculline）（Ｔｏｃｒｉｓ；Ｃａｔ　＃　０１３０）、酪酸ナトリウム（Ｓｉｇｍａ；Ｃａｔ　＃　Ｂ５８８７）。全ての増殖因子は０．１％　ＢＳＡ（Ｓｉｇｍａ；Ｃａｔ　＃　Ａ７８８８）添加ＰＢＳに溶解させて、－８０℃で凍結保存した。低分子は１００％　ＤＭＳＯ（Ｓｉｇｍａ；Ｃａｔ　＃　Ｄ２６５０）に溶解させて、－８０℃で凍結保存した。化合物は、９６ウェルプレートフォーマットで５ｍＭ原液として利用可能であり、１００％　ＤＭＳＯ中に溶解させて、－８０℃で保存した。本発明の化合物は更に、２０％　ＤＭＳＯ含有５０ｍＭ　ＨＥＰＥＳ（Ｉｎｖｉｔｒｏｇｅｎ；Ｃａｔ　＃　１５６３０－０８０）で０．２ｍＭの中間濃度へと希釈して、４℃で保存した。全ての増殖因子及び阻害物質は９６ウェルポリプロピレンプレートのディープウェル中に調製し、アッセイの開始時にＤＭＥＭ：Ｆ１２基本培地で５ｘ中間原液へと希釈し、４℃で保存した。

【０２９４】

３つ組複製で試験し、４日間のアッセイ時間枠にわたって隔日で培地を供給しながら、二次スクリーニングアッセイを実施した。各ウェルから培養培地を吸引し、続いてＰＢＳで３回洗浄して残留増殖因子及び血清を除去することで、アッセイを開始した。０．６２５％　ＦＣＳ（ＨｙＣｌｏｎｅ；Ｃａｔ　＃　ＳＨ３００７０．０３）、２５ｎｇ／ｍＬのＷｎｔ３ａ（Ｒ＆Ｄ　Ｓｙｓｔｅｍｓ）、及び３．１２５μＭ化合物に加えて２０μＬの増殖因子の又は低分子の５ｘ原液を添加したＤＭＥＭ：Ｆ１２基本培地（Ｉｎｖｉｔｒｏｇｅｎ；Ｃａｔ　＃　１１３３０－０３２）を、１ウェルあたり８０μＬの試験量で加え、最終濃度（０．５％　ＦＣＳ、２０ｎｇ／ｍＬのＷｎｔ３ａ、及び２．５μＭの化合物）を得た。残りの全ての増殖因子は５０ｎｇ／ｍＬの最終アッセイ濃度で試験した（ＥＧＦ、ＦＧＦ４、ＰＤＧＦ－Ａ、ＰＤＧＦ－Ｂ、ＰＤＧＦ－Ｃ、ＰＤＧＦ－Ｄ、ＰＤＧＦ－Ａ／Ｂ、ＶＥＧＦ、ＢＭＰ－１、ＢＭＰ－２、ＢＭＰ－４、ＢＭＰ－６、ＢＭＰ－７、ＢＭＰ－２／７）。試験した低分子の最終アッセイ濃度は以下のとおりである：ムシモール（２０μＭ）、ＰＤ９８０５９（１μＭ）、ＬＹ２９４００２（２．５μＭ）、Ｕ０１２４（１μＭ）、Ｕ０１２６（１μＭ）、酪酸ナトリウム（０．５ｍＭ）。陽性対照ウェル（１００μＬ／ウェル）には、０．５％　ＦＣＳ、２０ｎｇ／ｍＬのＷｎｔ３ａ及び１００ｎｇ／ｍＬのアクチビンＡを添加した同様の基本培地を含有させた。陰性対照ウェル（１００μＬ／ウェル）には、０．５％　ＦＣＳ、及び２０ｎｇ／ｍＬのＷｎｔ３ａを添加した、アクチビンＡは不含の同様の基本培地を含有させた。

【０２９５】
３日目にウェルを吸引し、２．５％　ＦＣＳ（ＨｙＣｌｏｎｅ）及び３．１２５μＭ環式アニリン－ピリジノトリアジン化合物に加えて２０μＬの増殖因子の又は低分子の５ｘ原液を添加したＤＭＥＭ：Ｆ１２基本培地を１ウェルあたりに８０μＬ加え、最終濃度（２％　ＦＣＳ及び２．５μＭの化合物（Ｗｎｔ３ａは不含）並びに残りの全ての増殖因子又は低分子については１日目に関して記載の濃度）を得た。陽性対照ウェル（１００μＬ／ウェル）には、２％　ＦＣＳ、及び１００ｎｇ／ｍＬのアクチビンＡを添加した、Ｗｎｔ３ａは不含の同様の基本培地を含有させた。陰性対照ウェル（１００μＬ／ウェル）には、２％　ＦＣＳを添加した、アクチビンＡ及びＷｎｔ３ａのどちらも不含の同様の基本培地を含有させた。

【０２９６】
ハイコンテンツな解析：４日間の培養の最後に、アッセイプレートをＰＢＳで２回洗浄し、４％パラホルムアルデヒド（Ａｌｅｘｉｓ　Ｂｉｏｃｈｅｍｉｃａｌ；Ｃａｔ　＃　ＡＬＸ－３５０－０１１）で室温で２０分間にわたって固定し、次いでＰＢＳで３回洗浄し、０．５％　Ｔｒｉｔｏｎ　Ｘ－１００（Ｓｉｇｍａ；Ｃａｔ　＃　Ｔ８７６０－２）で室温で２０分間にわたって透過処理した。細胞を再度ＰＢＳで３回洗浄し、４％ニワトリ血清（Ｉｎｖｉｔｒｏｇｅｎ；Ｃａｔ　＃　１６１１００８２）のＰＢＳ溶液で、室温で３０分間にわたってブロッキング処理した。一次抗体（ヤギ抗ヒトＳＯＸ１７；Ｒ＆Ｄ　Ｓｙｓｔｅｍｓ；Ｃａｔ　＃　ＡＦ１９２４）を４％ニワトリ血清に１：１００で希釈し、室温で１時間各ウェルに加えた。Ａｌｅｘａ　Ｆｌｕｏｒ　４８８を結合させた二次抗体（ニワトリ抗ヤギＩｇＧ；Ｍｏｌｅｃｕｌａｒ　Ｐｒｏｂｅｓ；Ｃａｔ　＃　ＡＺ１４６７）をＰＢＳに１：２００で希釈し、ＰＢＳで３回洗浄したあとの各サンプルウェルに加えた。核を対比染色するために、４μｇ／ｍＬ　Ｈｏｅｃｈｓｔ　３３３４２（Ｉｎｖｉｔｒｏｇｅｎ；Ｃａｔ　＃　Ｈ３５７０）を室温で１０分間加えた。プレートをＰＢＳで１回洗浄し、撮像のために１００μＬ／ウェルのＰＢＳで残した。

【０２９７】
Ｈｏｅｃｈｓｔ　３３３４２とＡｌｅｘａ　Ｆｌｕｏｒ　４８８とで染色した細胞用に５１００８ｂｓダイクロイックを利用して、ＩＮ　Ｃｅｌｌ　Ａｎａｌｙｚｅｒ　１０００（ＧＥ　Ｈｅａｌｔｈｃａｒｅ）を用いて撮像を実施した。曝露時間は陽性対照ウェル及び二次抗体単独で染色した未処理陰性対照ウェルから最適化した。１ウェルあたり１５視野の撮像を得て、バイオアッセイ及び続く染色手順の間の任意の細胞ロスを補正した。ＩＮ　Ｃｅｌｌ　Ｄｅｖｅｌｏｐｅｒ　Ｔｏｏｌｂｏｘ　１．７（ＧＥ　Ｈｅａｌｔｈｃａｒｅ）ソフトウェアを用いて総細胞数及び総ＳＯＸ１７強度についての測定値を各ウェルから得た。核の分裂は、グレースケールレベル（ベースライン範囲１００～３００）と核の大きさに基づいて判定した。各複製データセットについて平均及び標準偏差を算出した。総ＳＯＸ１７タンパク質発現は、細胞面積によって乗じた細胞の総蛍光値として定義される総強度又は積分強度として記録した。バックグラウンドは、２００～３５００の間のグレースケール範囲の許容基準に基づいて除去した。総強度データは、各ウェルについての総強度を陽性対照についての平均総強度で除することにより正規化した。各複製セットについて、平均及び標準偏差用に正規化データを算出した。

【０２９８】
表４は、増殖因子又は他の低分子のそれぞれと組み合わせての本発明の化合物での処理後の、胚体内胚葉系に特徴的なマーカーを発現している細胞へのヒト胚性幹細胞の分化についての結果を示す。概してＢＭＰファミリー（ＢＭＰ－１、ＢＭＰ－２、ＢＭＰ－４、ＢＭＰ－６、ＢＭＰ－７、ＢＭＰ－２／７）のメンバーはＳＯＸ１７発現を阻害したか、あるいはごくわずかに影響した。同じことが本アッセイで試験した低分子酵素阻害剤のほとんどにも当てはまった（ＬＹ２９４００２、ＰＤ９８０５９、Ｕ０１２６、Ｕ０１２４、酪酸ナトリウム）。しかしながら、ＰＤＧＦファミリーの一部のメンバー（ＰＤＧＦ－Ａ、－ＡＢ、－Ｃ及び－Ｄ）はＳＯＸ１７発現の増加をもたらした（アクチビンＡ／Ｗｎｔ３ａ対照の１０～２５％）。ＳＯＸ１７発現において同様の増加を示す他の増殖因子と

しては、ＥＧＦ（３４％）、ＶＥＧＦ（１８％）、及びＦＧＦ４（１７％）が挙げられるが、ＦＧＦ４は細胞数の保持を支持できなかった。化合物３５と組み合わせて試験した低分子ムシモール（$ＧＡＢＡ_A$受容体作動剤）もＳＯＸ１７発現に適度な増加をもたらした；$ＧＡＢＡ_A$拮抗剤のビククリンはＳＯＸ１７発現に対して何の効果も有さなかった。ＥＧＦ、ＦＧＦ４、ＰＤＧＦ－Ａ、ＰＤＧＦ－Ｂ、ＰＤＧＦ－ＡＢ、ＰＤＧＦ－Ｃ、及びＰＤＧＦ－Ｄ並びにムシモールを、胚体内胚葉分化時の更なる評価のために選択した。

【０２９９】

（実施例６）

アクチビンＡ非存在下での、胚体内胚葉系に特徴的なマーカーを発現している細胞へのヒト胚性幹細胞の分化に対する、本発明の化合物と他の因子との組み合わせの効果

胚体内胚葉分化に対しての異なる化合物と他のそれぞれの剤との組み合わせの効果を評価するために、二次アッセイを実施した。このスクリーニングのために選択された他の剤は、化合物１７について試験したように、及び表５で記載したように、前述した胚体内胚葉形成において適度な増加を示した。このスクリーニングにおいて、これらの剤と共に、単一の対での比較でか、あるいはプールされた組み合わせでのいずれかで、化合物のより広範なパネルを評価した。

【０３００】

細胞アッセイ播種：Ｈ１ヒト胚性幹細胞のクラスターを、ｇｒｏｗｔｈ　ｆａｃｔｏｒ－ｒｅｄｕｃｅｄ　MATRIGEL（商標）（Ｉｎｖｉｔｒｏｇｅｎ；Ｃａｔ　＃　３５６２３１）をコートした組織培養プラスチック上で増殖させた。細胞を、コラゲナーゼ（Ｉｎｖｉｔｒｏｇｅｎ；Ｃａｔ　＃　１７１０４－０１９）処理及び穏やかな掻爬により継代し、洗浄して残留酵素を除去し、ｇｒｏｗｔｈ　ｆａｃｔｏｒ－ｒｅｄｕｃｅｄ　ＭＡＴＲＩＧＥＬ（商標）を１００μＬ／ウェル用量使用してコートした９６ウェルブラックプレート（Ｐａｃｋａｒｄ　ＶｉｅｗＰｌａｔｅｓ；ＰｅｒｋｉｎＥｌｍｅｒ；Ｃａｔ　＃６００５１８２）上に均一に分散させて１：１（表面積）比で蒔いた。細胞をクラスター様に付着させ、次いで８ｎｇ／ｍＬのｂＦＧＦ（Ｒ＆Ｄ　Ｓｙｓｔｅｍｓ；Ｃａｔ　＃　２３３－ＦＢ）を添加したＭＥＦ馴化培地を毎日供給しながら１～３日経過させ、対数増殖期を回復させた。アッセイの持続時間の間、プレートは加湿したボックス中に３７℃、５％　$ＣＯ_2$で維持した。

【０３０１】

化合物及び増殖因子の調製：Ｒ＆Ｄ　Ｓｙｓｔｅｍｓから購入した増殖因子の貯蔵品は、ＥＧＦ（Ｃａｔ　＃　２３６－ＥＧ）、ＦＧＦ４（Ｃａｔ　＃２３５－Ｆ４）、ＰＤＧＦ－Ａ（Ｃａｔ　＃２２１－ＡＡ）、ＰＤＧＦ－Ｄ（Ｃａｔ　＃１１５９－ＳＢ）、ＰＤＧＦ－Ａ／Ｂ（Ｃａｔ　＃２２２－ＡＢ）、及びＶＥＧＦ（Ｃａｔ　＃２９３－ＶＥ）であった。ムシモールはＴｏｃｒｉｓから購入した（Ｃａｔ　＃　０２８９）。全ての増殖因子は０．１％　ＢＳＡ（Ｓｉｇｍａ；Ｃａｔ　＃　Ａ７８８８）添加ＰＢＳに溶解させて、－８０℃で凍結保存した。ムシモールは１００％　ＤＭＳＯ（Ｓｉｇｍａ；Ｃａｔ　＃　Ｄ２６５０）に溶解させて、－８０℃で凍結保存した。化合物は、９６ウェルプレートフォーマットで５ｍＭ原液として利用可能であり、１００％　ＤＭＳＯ中に溶解させて、－８０℃で保存した。化合物は更に、２０％　ＤＭＳＯ含有５０ｍＭ　ＨＥＰＥＳ（Ｉｎｖｉｔｒｏｇｅｎ；Ｃａｔ　＃　１５６３０－０８０）で０．２ｍＭの中間濃度へと希釈して、４℃で保存した。全ての増殖因子及び阻害物質は９６ウェルポリプロピレンプレートのディープウェル中に調製し、アッセイの開始時にＤＭＥＭ：Ｆ１２基本培地で５ｘ中間原液へと希釈し、４℃で保存した。

【０３０２】

３つ組複製で試験し、４日間のアッセイ時間枠にわたって隔日で培地を供給しながら、二次スクリーニングアッセイを実施した。各ウェルから培養培地を吸引し、続いてＰＢＳで３回洗浄して残留増殖因子及び血清を除去することで、アッセイを開始した。０．６２５％　ＦＣＳ（ＨｙＣｌｏｎｅ；Ｃａｔ　＃　ＳＨ３００７０．０３）、２５ｎｇ／ｍＬのＷｎｔ３ａ（Ｒ＆Ｄ　Ｓｙｓｔｅｍｓ）、及び３．１２５μＭの化合物に加えて２０μ

Ｌの増殖因子の又は低分子の５ｘ原液を添加したＤＭＥＭ：Ｆ１２基本培地（Ｉｎｖｉｔｒｏｇｅｎ；Ｃａｔ ＃ １１３３０－０３２）を、１ウェルあたり８０μＬの試験量で加え、最終濃度（０．５％ ＦＣＳ、２０ｎｇ／ｍＬのＷｎｔ３ａ、及び２．５μＭ）を得た。残りの全ての増殖因子は５０ｎｇ／ｍＬの最終アッセイ濃度で試験した（ＥＧＦ、ＦＧＦ４、ＰＤＧＦ－Ａ、ＰＤＧＦ－Ａ／Ｂ、ＶＥＧＦ）。ムシモールの最終アッセイ濃度は２０μＭであった。陽性対照ウェル（１００μＬ／ウェル）には、０．５％ ＦＣＳ、２０ｎｇ／ｍＬのＷｎｔ３ａ及び１００ｎｇ／ｍＬのアクチビンＡを添加した同様の基本培地を含有させた。陰性対照ウェル（１００μＬ／ウェル）には、０．５％ ＦＣＳ、２０ｎｇ／ｍＬのＷｎｔ３ａを添加した、アクチビンＡは不含の同様の基本培地を含有させた。

【０３０３】

３日目にウェルを吸引し、２．５％ ＦＣＳ（ＨｙＣｌｏｎｅ）及び３．１２５μＭの化合物に加えて２０μＬの増殖因子の又は低分子の５ｘ原液を添加したＤＭＥＭ：Ｆ１２基本培地を１ウェルあたりに８０μＬ加え、最終濃度（２％ ＦＣＳ及び２．５μＭの化合物（Ｗｎｔ３ａは不含）並びに残りの全ての増殖因子又は低分子については１日目に関して記載の濃度）を得た。陽性対照ウェル（１００μＬ／ウェル）には、２％ ＦＣＳ、及び１００ｎｇ／ｍＬのアクチビンＡを添加した、Ｗｎｔ３ａは不含の同様の基本培地を含有させた。陰性対照ウェル（１００μＬ／ウェル）には、２％ ＦＣＳを添加した、アクチビンＡ及びＷｎｔ３ａはどちらも不含の同様の基本培地を含有させた。

【０３０４】

ハイコンテンツな解析：４日間の培養の最後に、アッセイプレートをＰＢＳで２回洗浄し、４％パラホルムアルデヒド（Ａｌｅｘｉｓ Ｂｉｏｃｈｅｍｉｃａｌ；Ｃａｔ ＃ ＡＬＸ－３５０－０１１）で室温で２０分間にわたって固定し、次いでＰＢＳで３回洗浄し、０．５％ Ｔｒｉｔｏｎ Ｘ－１００（Ｓｉｇｍａ；Ｃａｔ ＃ Ｔ８７６０－２）で室温で２０分間にわたって透過処理した。細胞を再度ＰＢＳで３回洗浄し、４％ニワトリ血清（Ｉｎｖｉｔｒｏｇｅｎ；Ｃａｔ ＃ １６１１００８２）のＰＢＳ溶液で、室温で３０分間にわたってブロッキング処理した。一次抗体（ヤギ抗ヒトＳＯＸ１７；Ｒ＆Ｄ Ｓｙｓｔｅｍｓ；Ｃａｔ ＃ ＡＦ１９２４）を４％ニワトリ血清に１：１００で希釈し、室温で１時間各ウェルに加えた。Ａｌｅｘａ Ｆｌｕｏｒ ４８８を結合させた二次抗体（ニワトリ抗ヤギＩｇＧ；Ｍｏｌｅｃｕｌａｒ Ｐｒｏｂｅｓ；Ｃａｔ ＃ ＡＺ１４６７）をＰＢＳに１：２００で希釈し、ＰＢＳで３回洗浄したあとの各サンプルウェルに加えた。核を対比染色するために、４μｇ／ｍＬ Ｈｏｅｃｈｓｔ ３３３４２（Ｉｎｖｉｔｒｏｇｅｎ；Ｃａｔ ＃ Ｈ３５７０）を室温で１０分間加えた。プレートをＰＢＳで１回洗浄し、撮像のために１００μＬ／ウェルのＰＢＳで残した。

【０３０５】

Ｈｏｅｃｈｓｔ ３３３４２とＡｌｅｘａ Ｆｌｕｏｒ ４８８とで染色した細胞用に５１００８ｂｓダイクロイックを利用して、ＩＮ Ｃｅｌｌ Ａｎａｌｙｚｅｒ １０００（ＧＥ Ｈｅａｌｔｈｃａｒｅ）を用いて撮像を実施した。曝露時間は陽性対照ウェル及び二次抗体単独で染色した未処理陰性対照ウェルから最適化した。１ウェルあたり１５視野の撮像を得て、バイオアッセイ及び続く染色手順の間の任意の細胞ロスを補正した。ＩＮ Ｃｅｌｌ Ｄｅｖｅｌｏｐｅｒ Ｔｏｏｌｂｏｘ １．７（ＧＥ Ｈｅａｌｔｈｃａｒｅ）ソフトウェアを用いて総細胞数及び総ＳＯＸ１７強度についての測定値を各ウェルから得た。核の分裂は、グレースケールレベル（ベースライン範囲１００～３００）と核の大きさに基づいて判定した。各複製データセットについて平均及び標準偏差を算出した。総ＳＯＸ１７タンパク質発現は、細胞面積によって乗じた細胞の総蛍光値として定義される総強度又は積分強度として記録した。バックグラウンドは、２００～３５００の間のグレースケール範囲の許容基準に基づいて除去した。総強度データは、各ウェルについての総強度を陽性対照についての平均総強度で除することにより正規化した。各複製セットについて、平均及び標準偏差用に正規化データを算出した。

【０３０６】

表５は、アクチビンＡは加えずに増殖因子及びムシモールと様々に組み合わせて胚体内胚葉バイオアッセイで試験した、上に「ヒット」（表２）として同定した化合物を示す。一部の化合物は、試験した全ての増殖因子の組み合わせで、ＳＯＸ１７発現に対して最小のあるいは弱い効果を有した。しかしながら一部の化合物は、全ての増殖因子との組み合わせについてではないが、一部に関して、有意なＳＯＸ１７発現を誘導することができた。特にある１つの化合物（化合物３４）は、試験した全ての増殖因子に対して有意に相乗的な応答を有し、本アッセイにおいて細胞数並びにＳＯＸ１７発現の両方の上昇をとりなした：化合物３９は１）ＥＧＦ＋ＦＧＦ４で陽性対照の応答の７７％；又は２）ＥＧＦ＋ＦＧＦ４＋ＰＤＧＦ－ＡＢで陽性対照の応答の６８％；あるいは３）ＥＧＦ＋ＦＧＦ４＋ＰＤＧＦ－Ａ＋ＶＥＧＦで陽性対照の応答の３１％を有した。

【０３０７】

（実施例７）

アクチビンＡ非存在下での、胚体内胚葉系に特徴的なマーカーを発現している細胞へのヒト胚性幹細胞の分化に対する、化合物３４と他の因子との組み合わせの効果

本実施例では、アクチビンＡの非存在下で強いＳＯＸ１７応答を得るために、最も良好な環式アニリン－ピリジノトリアジン化合物（化合物３４）と組み合わせる必要がある増殖因子の最小数について解析するための試行がなされた。本実施例ではまた、新しい増殖因子、ＧＤＦ－８を評価に加えた。ＧＤＦ－８は、ミオスタチンとしても既知であり、ＴＧＦ－βファミリーのメンバーであり、これまでにアクチビンＩＩ型受容体及びＴＧＦ－βＩ型受容体（ＡＬＫ４／５）を使用してＳＭＡＤ　２／３リン酸化反応を誘導することが示されている。

【０３０８】

細胞アッセイ播種：Ｈ１ヒト胚性幹細胞のクラスターを、ｇｒｏｗｔｈ　ｆａｃｔｏｒ－ｒｅｄｕｃｅｄ　ＭＡＴＲＩＧＥＬ（商標）（Ｉｎｖｉｔｒｏｇｅｎ；Ｃａｔ　＃　３５６２３１）をコートした組織培養プラスチック上で増殖させた。細胞を、コラゲナーゼ（Ｉｎｖｉｔｒｏｇｅｎ；Ｃａｔ　＃　１７１０４－０１９）処理及び穏やかな掻爬により継代し、洗浄して残留酵素を除去し、ｇｒｏｗｔｈ　ｆａｃｔｏｒ－ｒｅｄｕｃｅｄ　ＭＡＴＲＩＧＥＬ（商標）を１００μＬ／ウェル用量使用してコートした９６ウェルブラックプレート（Ｐａｃｋａｒｄ　ＶｉｅｗＰｌａｔｅｓ；ＰｅｒｋｉｎＥｌｍｅｒ；Ｃａｔ　＃６００５１８２）上に均一に分散させて１：１（表面積）比で蒔いた。細胞をクラスター様に付着させ、次いで８ｎｇ／ｍＬのｂＦＧＦ（Ｒ＆Ｄ　Ｓｙｓｔｅｍｓ；Ｃａｔ　＃　２３３－ＦＢ）を添加したＭＥＦ馴化培地を毎日供給しながら１～３日経過させ、対数増殖期を回復させた。アッセイの持続時間の間、プレートは加湿したボックス中に３７℃、５％　CO_2で維持した。

【０３０９】

化合物及び増殖因子の調製：Ｒ＆Ｄ　Ｓｙｓｔｅｍｓから購入した増殖因子の貯蔵品は、ＥＧＦ（Ｃａｔ　＃　２３６－ＥＧ）、ＦＧＦ４（Ｃａｔ　＃２３５－Ｆ４）、ＰＤＧＦ－Ａ（Ｃａｔ　＃２２１－ＡＡ）、ＰＤＧＦ－Ｄ（Ｃａｔ　＃１１５９－ＳＢ）、ＰＤＧＦ－Ａ／Ｂ（Ｃａｔ　＃２２２－ＡＢ）、ＶＥＧＦ（Ｃａｔ　＃２９３－ＶＥ）、及びＧＤＦ－８（Ｃａｔ　＃　７８８－Ｇ８）であった。ムシモールはＴｏｃｒｉｓから購入した（Ｃａｔ　＃　０２８９）。全ての増殖因子は０．１％　ＢＳＡ（Ｓｉｇｍａ；Ｃａｔ　＃　Ａ７８８８）添加ＰＢＳに溶解させて、－８０℃で凍結保存した。ムシモールは１００％　ＤＭＳＯ（Ｓｉｇｍａ；Ｃａｔ　＃　Ｄ２６５０）に溶解させて、－８０℃で凍結保存した。環式アニリン－ピリジノトリアジン化合物は９６ウェルプレートフォーマットで５ｍＭ原液として利用可能であり、１００％　ＤＭＳＯ中に溶解させて、－８０℃で保存した。化合物３４は更に、２０％　ＤＭＳＯ含有５０ｍＭ　ＨＥＰＥＳ（Ｉｎｖｉｔｒｏｇｅｎ；Ｃａｔ　＃　１５６３０－０８０）で０．２ｍＭの中間濃度へと希釈して、４℃で保存した。全ての増殖因子及び阻害物質は９６ウェルポリプロピレンプレートのディープウェル中に調製し、アッセイの開始時にＤＭＥＭ：Ｆ１２基本培地で５ｘ中間原液へと希釈し、４℃で保存した。

【０３１０】

３つ組複製で試験し、４日間のアッセイ時間枠にわたって隔日で培地供給しながら、二次スクリーニングアッセイを実施した。各ウェルから培養培地を吸引し、続いてＰＢＳで３回洗浄して残留増殖因子及び血清を除去することで、アッセイを開始した。０．６２５％　ＦＣＳ（ＨｙＣｌｏｎｅ；Ｃａｔ　＃　ＳＨ３００７０．０３）、２５ｎｇ／ｍＬのＷｎｔ３ａ（Ｒ＆Ｄ　Ｓｙｓｔｅｍｓ）、及び３．１２５μＭ化合物２７に加えて２０μＬの増殖因子の又は低分子の５ｘ原液を添加したＤＭＥＭ：Ｆ１２基本培地（Ｉｎｖｉｔｒｏｇｅｎ；Ｃａｔ　＃　１１３３０－０３２）を、１ウェルあたり８０μＬの試験量で加え、最終濃度（０．５％　ＦＣＳ、２０ｎｇ／ｍＬのＷｎｔ３ａ、及び２．５μＭの化合物３４）を得た。ＧＤＦ－８を２５ｎｇ／ｍＬで試験したことを除いて、残りの全ての増殖因子を５０ｎｇ／ｍＬの最終アッセイ濃度で試験した（ＥＧＦ、ＦＧＦ４、ＰＤＧＦ－Ａ、ＰＤＧＦ－Ａ／Ｂ、ＶＥＧＦ）。ムシモールの最終アッセイ濃度は２０μＭであった。陽性対照ウェル（１００μＬ／ウェル）には、０．５％　ＦＣＳ、２０ｎｇ／ｍＬのＷｎｔ３ａ及び１００ｎｇ／ｍＬのアクチビンＡを添加した同様の基本培地を含有させた。陰性対照ウェル（１００μＬ／ウェル）には、０．５％　ＦＣＳ、及び２０ｎｇ／ｍＬのＷｎｔ３ａを添加した、アクチビンＡは不含の同様の基本培地を含有させた。

【０３１１】

３日目にウェルを吸引し、２．５％　ＦＣＳ（ＨｙＣｌｏｎｅ）及び３．１２５μＭ化合物３４に加えて２０μＬの増殖因子の又は低分子の５ｘ原液を添加したＤＭＥＭ：Ｆ１２基本培地を１ウェルあたりに８０μＬ加え、最終濃度（２％　ＦＣＳ及び２．５μＭの化合物３４（Ｗｎｔ３ａは不含）並びに残りの全ての増殖因子又は低分子については１日目に関して記載の濃度）を得た。陽性対照ウェル（１００μＬ／ウェル）には、２％　ＦＣＳ、及び１００ｎｇ／ｍＬのアクチビンＡを添加した、Ｗｎｔ３ａは不含の同様の基本培地を含有させた。陰性対照ウェル（１００μＬ／ウェル）には、２％　ＦＣＳを添加した、アクチビンＡ及びＷｎｔ３ａはどちらも不含の同様の基本培地を含有させた。

【０３１２】

ハイコンテンツな解析：４日間の培養の最後に、アッセイプレートをＰＢＳで２回洗浄し、４％パラホルムアルデヒド（Ａｌｅｘｉｓ　Ｂｉｏｃｈｅｍｉｃａｌ；Ｃａｔ　＃　ＡＬＸ－３５０－０１１）で室温で２０分間にわたって固定し、次いでＰＢＳで３回洗浄し、０．５％　Ｔｒｉｔｏｎ　Ｘ－１００（Ｓｉｇｍａ；Ｃａｔ　＃　Ｔ８７６０－２）で室温で２０分間にわたって透過処理した。細胞を再度ＰＢＳで３回洗浄し、４％ニワトリ血清（Ｉｎｖｉｔｒｏｇｅｎ；Ｃａｔ　＃　１６１１００８２）のＰＢＳ溶液で、室温で３０分間にわたってブロッキング処理した。一次抗体（ヤギ抗ヒトＳＯＸ１７；Ｒ＆Ｄ　Ｓｙｓｔｅｍｓ；Ｃａｔ　＃　ＡＦ１９２４）を４％ニワトリ血清に１：１００で希釈し、室温で１時間各ウェルに加えた。Ａｌｅｘａ　Ｆｌｕｏｒ　４８８を結合させた二次抗体（ニワトリ抗ヤギＩｇＧ；Ｍｏｌｅｃｕｌａｒ　Ｐｒｏｂｅｓ；Ｃａｔ　＃　ＡＺ１４６７）をＰＢＳに１：２００で希釈し、ＰＢＳで３回洗浄したあとの各サンプルウェルに加えた。核を対比染色するために、４μｇ／ｍＬ　Ｈｏｅｃｈｓｔ　３３３４２（Ｉｎｖｉｔｒｏｇｅｎ；Ｃａｔ　＃　Ｈ３５７０）を室温で１０分間加えた。プレートをＰＢＳで１回洗浄し、撮像のために１００μＬ／ウェルのＰＢＳで残した。

【０３１３】

Ｈｏｅｃｈｓｔ　３３３４２とＡｌｅｘａ　Ｆｌｕｏｒ　４８８とで染色した細胞用に５１００８ｂｓダイクロイックを利用して、ＩＮ　Ｃｅｌｌ　Ａｎａｌｙｚｅｒ　１０００（ＧＥ　Ｈｅａｌｔｈｃａｒｅ）を用いて撮像を実施した。曝露時間は陽性対照ウェル及び二次抗体単独で染色した未処理陰性対照ウェルから最適化した。１ウェルあたり１５視野の撮像を得て、バイオアッセイ及び続く染色手順の間の任意の細胞ロスを補正した。ＩＮ　Ｃｅｌｌ　Ｄｅｖｅｌｏｐｅｒ　Ｔｏｏｌｂｏｘ　１．７（ＧＥ　Ｈｅａｌｔｈｃａｒｅ）ソフトウェアを用いて総細胞数及び総ＳＯＸ１７強度についての測定値を各ウェルから得た。核の分裂は、グレースケールレベル（ベースライン範囲１００～３００）と核の大きさに基づいて判定した。各複製データセットについて平均及び標準偏差を算出し

た。総ＳＯＸ１７タンパク質発現は、細胞面積によって乗じた細胞の総蛍光値として定義される総強度又は積分強度として記録した。バックグラウンドは、２００～３５００の間のグレースケール範囲の許容基準に基づいて除去した。総強度データは、各ウェルについての総強度を陽性対照についての平均総強度で除することにより正規化した。各複製セットについて、平均及び標準偏差用に正規化データを算出した。

【０３１４】

表６は、このアッセイの結果を示す。ＧＤＦ－８が化合物３４と任意の組み合わせで存在する場合、ＳＯＸ１７発現についてかなりの上昇が観察された。加えて、化合物３４とＧＤＦ－８及びＷｎｔ３ａとの組み合わせは、１００ｎｇ／ｍＬのアクチビンＡ／Ｗｎｔ３ａ処理について見られるのと同様の範囲で、十分なＳＯＸ１７発現（対照の８８％）をもたらした。ヒト胚性幹細胞の胚体内胚葉分化時に、増殖因子ＧＤＦ－８がアクチビンＡの代替物として機能し得ることは明白である。

【０３１５】

（実施例８）

胚体内胚葉系に特徴的なマーカーを発現している細胞へと多能性幹細胞を分化させ得る化合物についての、更なるスクリーニング

これまでに「ヒット」として同定した化合物の構造に基づいて類似体検索を実施し、更なる関連づけられる化合物を探し出して胚体内胚葉バイオアッセイで試験した。部分構造検索により、スクリーニングのための化合物を得た。本アッセイのためのスクリーニングパラメーターは、前述のアッセイで最適の結果が得られた因子の組み合わせで設計し、具体的にはＥＧＦ、ＦＧＦ、ＰＤＧＦ－Ａ、ＶＥＧＦ、ＰＤＧＦ－Ｄ、ムシモール、及びＧＤＦ－８を、低分子化合物と組み合わせることで設計した。

【０３１６】

細胞アッセイ播種：簡潔に述べると、Ｈ１ヒト胚性幹細胞のクラスターを、ｇｒｏｗｔｈ　ｆａｃｔｏｒ－ｒｅｄｕｃｅｄ　ＭＡＴＲＩＧＥＬ（商標）（Ｉｎｖｉｔｒｏｇｅｎ；Ｃａｔ　＃　３５６２３１）をコートした組織培養プラスチック上で増殖させた。細胞を、コラゲナーゼ（Ｉｎｖｉｔｒｏｇｅｎ；Ｃａｔ　＃　１７１０４－０１９）処理及び穏やかな掻爬により継代し、洗浄して残留酵素を除去し、ｇｒｏｗｔｈ　ｆａｃｔｏｒ－ｒｅｄｕｃｅｄ　ＭＡＴＲＩＧＥＬ（商標）を１００μＬ／ウェル用量使用してコートした９６ウェルブラックプレート（Ｐａｃｋａｒｄ　ＶｉｅｗＰｌａｔｅｓ；Ｐｅｒｋｉｎ　Ｅｌｍｅｒ；Ｃａｔ　＃６００５１８２）上に均一に分散させて1：１（表面積）比で蒔いた。細胞をクラスター様に付着させ、次いで８ｎｇ／ｍＬのｂＦＧＦ（Ｒ＆Ｄ　Ｓｙｓｔｅｍｓ；Ｃａｔ　＃　２３３－ＦＢ）を添加したＭＥＦ馴化培地を毎日供給しながら１～３日経過させ、対数増殖期を回復させた。アッセイの持続時間の間、プレートは加湿したボックス中に３７℃、５％　CO_2で維持した。

【０３１７】

化合物の調製及びアッセイ：Ｒ＆Ｄ　Ｓｙｓｔｅｍｓから購入した増殖因子は、ＥＧＦ（Ｃａｔ　＃　２３６－ＥＧ）、ＦＧＦ４（Ｃａｔ　＃２３５－Ｆ４）、ＰＤＧＦ－Ａ（Ｃａｔ　＃２２１－ＡＡ）、ＰＤＧＦ－Ｄ（Ｃａｔ　＃１１５９－ＳＢ）、ＰＤＧＦ－Ａ／Ｂ（Ｃａｔ　＃２２２－ＡＢ）、ＶＥＧＦ（Ｃａｔ　＃２９３－ＶＥ）、及びＧＤＦ－８（Ｃａｔ　＃　７８８－Ｇ８）であった。ムシモールはＴｏｃｒｉｓから購入した（Ｃａｔ＃０２８９）。９６ウェルプレートフォーマットで５ｍＭ原液として利用できるように作製し、１００％　ＤＭＳＯ（Ｓｉｇｍａ；Ｃａｔ　＃　Ｄ２６５０）中に溶解させて、－８０℃で保存した化合物のライブラリを用いてスクリーニングを実施した。化合物は更に、２０％　ＤＭＳＯ含有５０ｍＭ　ＨＥＰＥＳ（Ｉｎｖｉｔｒｏｇｅｎ；Ｃａｔ　＃　１５６３０－０８０）で０．２ｍＭの中間濃度へと希釈して、４℃で保存した。試験条件は単ウェルで実施し、４日間のアッセイ期間にわたって隔日で培地供給した。各ウェルから培養培地を吸引し、続いてＰＢＳ（Ｉｎｖｉｔｒｏｇｅｎ；Ｃａｔ　＃　１４１９０）で３回洗浄して残留増殖因子及び血清を除去することで、一次スクリーニングアッセイを開始した。０．５％　ＦＣＳ（ＨｙＣｌｏｎｅ；Ｃａｔ　＃　ＳＨ３００７０．０３）

及び２０ｎｇ／ｍＬのＷｎｔ３ａ（Ｒ&Ｄ Ｓｙｓｔｅｍｓ；Ｃａｔ ＃ １３２４－ＷＮ）に加えて2．５μＭの化合物を添加したＤＭＥＭ：Ｆ１２基本培地（Ｉｎｖｉｔｒｏｇｅｎ；Ｃａｔ ＃ １１３３０－０３２）を、アッセイの初日に1ウェルあたり２００μＬの試験量で加えた。ＧＤＦ－８を２５ｎｇ／ｍＬで試験したことを除いて、残りの全ての増殖因子を５０ｎｇ／ｍＬの最終アッセイ濃度で試験した（ＥＧＦ、ＦＧＦ４、ＰＤＧＦ－Ａ、ＰＤＧＦ－Ａ／Ｂ、ＶＥＧＦ）。ムシモールの最終アッセイ濃度は２０μＭであった。陽性対照サンプルには、０．５％ＦＣＳに加えて２０ｎｇ／ｍＬのＷｎｔ３ａ及び１００ｎｇ／ｍＬヒト組換えアクチビンＡ（ＰｅｐｒｏＴｅｃｈ；Ｃａｔ ＃１２０－１４）を添加した同様の基本培地を含有させた。陰性対照サンプルには、０．５％ＦＣＳ及び２０ｎｇ／ｍＬのＷｎｔ３ａを添加したＤＭＥＭ：Ｆ１２基本培地を含有させた。アッセイの3日目に、２％ ＦＣＳに加え2．５μＭの化合物を添加した、Ｗｎｔ３ａは不含のＤＭＥＭ：Ｆ１２基本培地を、１ウェルあたり２００μＬの試験量で加えた。ＧＤＦ－８を２５ｎｇ／ｍＬで試験したことは除いて、残りの全ての増殖因子を５０ｎｇ／ｍＬの最終アッセイ濃度で試験した（ＥＧＦ、ＦＧＦ４、ＰＤＧＦ－Ａ、ＰＤＧＦ－Ａ／Ｂ、ＶＥＧＦ）。ムシモールの最終アッセイ濃度は２０μＭであった。陽性対照サンプルには、２％ ＦＣＳ及び１００ｎｇ／ｍＬヒト組換えアクチビンＡ（ＰｅｐｒｏＴｅｃｈ；Ｃａｔ ＃ １２０－１４）を添加した同様の基本培地を含有させた。陰性対照サンプルには、２％ ＦＣＳを添加したＤＭＥＭ：Ｆ１２基本培地を含有させた。陽性対照サンプルには、ＦＣＳを添加しアニリン－ピリジノトリアジン化合物を１００ｎｇ／ｍＬヒト組換えアクチビンＡ（ＰｅｐｒｏＴｅｃｈ；Ｃａｔ ＃ １２０－１４）で置き換えた同様の基本培地を含有させ、４日間のアッセイを通して１日目と２日目にＷｎｔ３ａ（２０ｎｇ／ｍＬ）を加えた。陰性対照サンプルには、ＦＣＳを添加したＤＭＥＭ：Ｆ１２基本培地を含有させ、１日目と２日目にはＷｎｔ３ａを加えたが、アクチビンＡによる処理は含めなかった。

【０３１８】

ハイコンテンツな解析：４日間の培養の最後に、アッセイプレートをＰＢＳ（Ｉｎｖｉｔｒｏｇｅｎ；Ｃａｔ ＃ １４１９０）で2回洗浄し、４％パラホルムアルデヒド（Ａｌｅｘｉｓ Ｂｉｏｃｈｅｍｉｃａｌ；Ｃａｔ ＃ ＡＬＸ－３５０－０１１）で室温で２０分間にわたって固定し、次いでＰＢＳで3回洗浄し、０．５％ Ｔｒｉｔｏｎ Ｘ－１００（Ｓｉｇｍａ；Ｃａｔ ＃ Ｔ８７６０－２）で室温で２０分間にわたって透過処理した。細胞を再度ＰＢＳで3回洗浄し、４％ニワトリ血清（Ｉｎｖｉｔｒｏｇｅｎ；Ｃａｔ ＃ １６１１００８２）のＰＢＳ溶液で、室温で３０分間にわたってブロッキング処理した。一次抗体（ヤギ抗ヒトＳＯＸ１７；Ｒ&Ｄ Ｓｙｓｔｅｍｓ；Ｃａｔ ＃ ＡＦ１９２４）を４％ニワトリ血清に１：１００で希釈し、室温で１時間各ウェルに加えた。Ａｌｅｘａ Ｆｌｕｏｒ ４８８を結合させた二次抗体（ニワトリ抗ヤギＩｇＧ；Ｍｏｌｅｃｕｌａｒ Ｐｒｏｂｅｓ；Ｃａｔ ＃ ＡＺ１４６７）をＰＢＳに１：２００で希釈し、ＰＢＳで3回洗浄したあとの各サンプルウェルに加えた。核を対比染色するために、４μｇ／ｍＬ Ｈｏｅｃｈｓｔ ３３３４２（Ｉｎｖｉｔｒｏｇｅｎ；Ｃａｔ ＃ Ｈ３５７０）を室温で１０分間加えた。プレートをＰＢＳで１回洗浄し、撮像のために１００μＬ／ウェルのＰＢＳで残した。

【０３１９】

Ｈｏｅｃｈｓｔ ３３３４２とＡｌｅｘａ Ｆｌｕｏｒ ４８８とで染色した細胞用に５１００８ｂｓダイクロイックを利用して、ＩＮ Ｃｅｌｌ Ａｎａｌｙｚｅｒ １０００（ＧＥ Ｈｅａｌｔｈｃａｒｅ）を用いて撮像を実施した。曝露時間は陽性対照ウェル及び二次抗体単独で染色した未処理陰性対照ウェルから最適化した。１ウェルあたり１５視野の撮像を得て、バイオアッセイ及び続く染色手順の間の任意の細胞ロスを補正した。ＩＮ Ｃｅｌｌ Ｄｅｖｅｌｏｐｅｒ Ｔｏｏｌｂｏｘ １．７（ＧＥ Ｈｅａｌｔｈｃａｒｅ）ソフトウェアを用いて総細胞数及び総ＳＯＸ１７強度についての測定値を各ウェルから得た。核の分裂は、グレースケールレベル（ベースライン範囲１００～３００）と核の大きさに基づいて判定した。各複製データセットについて平均及び標準偏差を算出し

た。総ＳＯＸ１７タンパク質発現は、細胞面積によって乗じた細胞の総蛍光値として定義される総強度又は積分強度として記録した。バックグラウンドは、２００～３５００の間のグレースケール範囲の許容基準に基づいて除去した。総強度データは、各ウェルについての総強度を陽性対照についての平均総強度で除することにより正規化した。各複製セットについて、平均及び標準偏差用に正規化データを算出した。

【０３２０】

表７では、ＧＤＦ－８と、増殖因子／作動剤（ＥＧＦ、ＦＧＦ、ＰＤＧＦ－Ａ、ＶＥＧＦ、ＰＤＧＦ－Ｄ、ムシモール）の組み合わせとを、アニリン－ピリジノトリアジン化合物の新しいセットについて試験した。この単独の実験で２つのアッセイプレートから得られた結果を、ＳＯＸ１７応答について等級づけした（アクチビンＡ及びＷｎｔ３ａによる陽性対照処理に対しての百分率として）。増殖因子／作動剤プールに対して有意な相乗的な活性を示す更なる化合物を同定した。これらの化合物は、アクチビンＡの非存在下でのヒト胚性幹細胞の分化時の、アッセイ細胞数の保持及びＳＯＸ１７発現の獲得の両方において有効である。陽性対照の２５％活性を超えるこれらの「ヒット」化合物の一覧を表８に示す。

【０３２１】

注目すべき、最初の一次スクリーニング（表２）からの４つのヒット化合物は、類似体ライブラリで２つ組複製だった。これらの化合物の内２つの化合物は類似体スクリーニングで繰り返してヒット化合物とされ（化合物３４及び化合物３５；表８に示されている）；１つは類似体スクリーニングでは弱いヒットであるとされ、１つは繰り返してはヒットとされなかった。

【０３２２】

（実施例９）

低濃度のアクチビンＡ存在下での、胚体内胚葉系に特徴的なマーカーを発現している細胞へのヒト胚性幹細胞の分化に対する、本発明の化合物の効果

上記の胚体内胚葉バイオアッセイで「ヒット」として同定された化合物が、非常に低濃度のアクチビンＡについても相乗的な活性を示し得るかを判定することは、非常に重要であった。表３Ｂに記載の環式アニリン－ピリジノトリアジン化合物の簡潔なヒット一覧を用いて、一次評価を実施した。

【０３２３】

細胞アッセイ播種：Ｈ１ヒト胚性幹細胞のクラスターを、ｇｒｏｗｔｈ　ｆａｃｔｏｒ－ｒｅｄｕｃｅｄ　MATRIGEL（商標）（Ｉｎｖｉｔｒｏｇｅｎ；Ｃａｔ　＃　３５６２３１）をコートした組織培養プラスチック上で増殖させた。細胞を、コラゲナーゼ（Ｉｎｖｉｔｒｏｇｅｎ；Ｃａｔ　＃　１７１０４－０１９）処理及び穏やかな掻爬により継代し、洗浄して残留酵素を除去し、ｇｒｏｗｔｈ　ｆａｃｔｏｒ－ｒｅｄｕｃｅｄ　ＭＡＴＲＩＧＥＬ（商標）を１００μＬ／ウェル用量使用してコートした９６ウェルブラックプレート（Ｐａｃｋａｒｄ　ＶｉｅｗＰｌａｔｅｓ；ＰｅｒｋｉｎＥｌｍｅｒ；Ｃａｔ　＃　６００５１８２）上に均一に分散させて１：１（表面積）比で蒔いた。細胞をクラスター様に付着させ、次いで８ｎｇ／ｍＬのｂＦＧＦ（Ｒ＆Ｄ　Ｓｙｓｔｅｍｓ；Ｃａｔ　＃　２３３－ＦＢ）を添加したＭＥＦ馴化培地を毎日供給しながら１～３日経過させ、対数増殖期を回復させた。アッセイの持続時間の間、プレートは加湿したボックス中に３７℃、５％　CO_2で維持した。

【０３２４】

化合物及び増殖因子の調製：Ｒ＆Ｄ　Ｓｙｓｔｅｍｓから購入した増殖因子の貯蔵品は、ＥＧＦ（Ｃａｔ　＃　２３６－ＥＧ）、ＦＧＦ４（Ｃａｔ　＃２３５－Ｆ４）、ＰＤＧＦ－Ａ（Ｃａｔ　＃２２１－ＡＡ）、ＰＤＧＦ－Ｄ（Ｃａｔ　＃１１５９－ＳＢ）、ＰＤＧＦ－Ａ／Ｂ（Ｃａｔ　＃２２２－ＡＢ）、ＶＥＧＦ（Ｃａｔ　＃２９３－ＶＥ）、及びＧＤＦ－８（Ｃａｔ　＃７８８－Ｇ８）であった。アクチビンＡはＰｅｐｒｏＴｅｃｈから購入した（Ｃａｔ　＃）。ムシモールはＴｏｃｒｉｓから購入した（Ｃａｔ　＃　０２８９）。全ての増殖因子は０．１％　ＢＳＡ（Ｓｉｇｍａ；Ｃａｔ　＃　Ａ７８８８）添

加ＰＢＳに溶解させて、－８０℃で凍結保存した。ムシモールは１００％　ＤＭＳＯ（Ｓｉｇｍａ；Ｃａｔ　＃　Ｄ２６５０）に溶解させて、－８０℃で凍結保存した。化合物は、９６ウェルプレートフォーマットで５ｍＭ原液として利用可能であり、１００％　ＤＭＳＯ中に溶解させて、－８０℃で保存した。化合物は更に、２０％　ＤＭＳＯ含有５０ｍＭ　ＨＥＰＥＳ（Ｉｎｖｉｔｒｏｇｅｎ；Ｃａｔ　＃　１５６３０－０８０）で０．２ｍＭの中間濃度へと希釈して、４℃で保存した。全ての増殖因子及び阻害物質は９６ウェルポリプロピレンプレートのディープウェル中に調製し、アッセイの開始時にＤＭＥＭ：Ｆ１２基本培地で５ｘ中間原液へと希釈し、４℃で保存した。

【０３２５】

３つ組複製で試験し、４日間のアッセイ時間枠にわたって隔日で培地供給しながら、二次スクリーニングアッセイを実施した。各ウェルから培養培地を吸引し、続いてＰＢＳで３回洗浄して残留増殖因子及び血清を除去することで、アッセイを開始した。０．６２５％　ＦＣＳ（ＨｙＣｌｏｎｅ；Ｃａｔ　＃　ＳＨ３００７０．０３）、２５ｎｇ／ｍＬのＷｎｔ３ａ（Ｒ＆Ｄ　Ｓｙｓｔｅｍｓ）、１２．５ｎｇ／ｍＬのアクチビンＡ及び３．１２５μＭ化合物に加えて２０μＬの増殖因子の又は低分子の５ｘ原液を添加したＤＭＥＭ：Ｆ１２基本培地（Ｉｎｖｉｔｒｏｇｅｎ；Ｃａｔ　＃　１１３３０－０３２）を、１ウェルあたり８０μＬの試験量で加え、最終濃度（０．５％　ＦＣＳ、２０ｎｇ／ｍＬのＷｎｔ３ａ、１０ｎｇ／ｍＬのアクチビンＡ及び２．５μＭの化合物）を得た。ＧＤＦ－８を２５ｎｇ／ｍＬで使用したことは除いて、残りの全ての増殖因子を５０ｎｇ／ｍＬの最終アッセイ濃度で試験した（ＥＧＦ、ＦＧＦ４、ＰＤＧＦ－Ａ、ＰＤＧＦ－Ａ／Ｂ、ＶＥＧＦ）。ムシモールの最終アッセイ濃度は２０μＭであった。陽性対照ウェル（１００μＬ／ウェル）には、０．５％　ＦＣＳ、２０ｎｇ／ｍＬのＷｎｔ３ａ、及び１０ｎｇ／ｍＬ（低用量）又は１００ｎｇ／ｍＬ（高用量）のアクチビンＡを添加した同様の基本培地を含有させた。陰性対照ウェル（１００μＬ／ウェル）には、０．５％　ＦＣＳ、２０ｎｇ／ｍＬのＷｎｔ３ａを添加した、アクチビンＡは不含の同様の基本培地を含有させた。

【０３２６】

３日目にウェルを吸引し、２．５％　ＦＣＳ（ＨｙＣｌｏｎｅ）、１２．５ｎｇ／ｍＬのアクチビンＡ及び３．１２５μＭ化合物に加えて２０μＬの増殖因子の又は低分子の５ｘ原液を添加したＤＭＥＭ：Ｆ１２基本培地を１ウェルあたりに８０μＬ加え、最終濃度（２％　ＦＣＳ、１０ｎｇ／ｍＬのアクチビンＡ、及び２．５μＭの化合物（Ｗｎｔ３ａは不含）並びに残りの全ての増殖因子又は低分子については１日目に関して記載の濃度）を得た。陽性対照ウェル（１００μＬ／ウェル）には、２％　ＦＣＳ、及び１０ｎｇ／ｍＬ又は１００ｎｇ／ｍＬのアクチビンＡを添加した、Ｗｎｔ３ａは不含の同様の基本培地を含有させた。陰性対照ウェル（１００μＬ／ウェル）には、２％　ＦＣＳを添加した、アクチビンＡ及びＷｎｔ３ａはどちらも不含の同様の基本培地を含有させた。

【０３２７】

ハイコンテンツな解析：４日間の培養の最後に、アッセイプレートをＰＢＳで２回洗浄し、４％パラホルムアルデヒド（Ａｌｅｘｉｓ　Ｂｉｏｃｈｅｍｉｃａｌ；Ｃａｔ　＃　ＡＬＸ－３５０－０１１）で室温で２０分間にわたって固定し、次いでＰＢＳで３回洗浄し、０．５％　Ｔｒｉｔｏｎ　Ｘ－１００（Ｓｉｇｍａ；Ｃａｔ　＃　Ｔ８７６０－２）で室温で２０分間にわたって透過処理した。細胞を再度ＰＢＳで３回洗浄し、４％ニワトリ血清（Ｉｎｖｉｔｒｏｇｅｎ；Ｃａｔ　＃　１６１１００８２）のＰＢＳ溶液で、室温で３０分間にわたってブロッキング処理した。一次抗体（ヤギ抗ヒトＳＯＸ１７；Ｒ＆Ｄ　Ｓｙｓｔｅｍｓ；Ｃａｔ　＃　ＡＦ１９２４）を４％ニワトリ血清に１：１００で希釈し、室温で１時間各ウェルに加えた。Ａｌｅｘａ　Ｆｌｕｏｒ　４８８を結合させた二次抗体（ニワトリ抗ヤギＩｇＧ；Ｍｏｌｅｃｕｌａｒ　Ｐｒｏｂｅｓ；Ｃａｔ　＃　ＡＺ１４６７）をＰＢＳに１：２００で希釈し、ＰＢＳで３回洗浄したあとの各サンプルウェルに加えた。核を対比染色するために、４μｇ／ｍＬ　Ｈｏｅｃｈｓｔ　３３３４２（Ｉｎｖｉｔｒｏｇｅｎ；Ｃａｔ　＃　Ｈ３５７０）を室温で１０分間加えた。プレートをＰＢＳで１回洗浄し、撮像のために１００μＬ／ウェルのＰＢＳで残した。

【０３２８】
　Ｈｏｅｃｈｓｔ　３３３４２とＡｌｅｘａ　Ｆｌｕｏｒ　４８８とで染色した細胞用に５１００８ｂｓダイクロイックを利用して、ＩＮ　Ｃｅｌｌ　Ａｎａｌｙｚｅｒ　１０００（ＧＥ　Ｈｅａｌｔｈｃａｒｅ）を用いて撮像を実施した。曝露時間は陽性対照ウェル及び二次抗体単独で染色した未処理陰性対照ウェルから最適化した。１ウェルあたり１５視野の撮像を得て、バイオアッセイ及び続く染色手順の間の任意の細胞ロスを補正した。ＩＮ　Ｃｅｌｌ　Ｄｅｖｅｌｏｐｅｒ　Ｔｏｏｌｂｏｘ　１．７（ＧＥ　Ｈｅａｌｔｈｃａｒｅ）ソフトウェアを用いて総細胞数及び総ＳＯＸ１７強度についての測定値を各ウェルから得た。核の分裂は、グレースケールレベル（ベースライン範囲１００～３００）と核の大きさに基づいて判定した。各複製データセットについて平均及び標準偏差を算出した。総ＳＯＸ１７タンパク質発現は、細胞面積によって乗じた細胞の総蛍光値として定義される総強度又は積分強度として記録した。バックグラウンドは、２００～３５００の間のグレースケール範囲の許容基準に基づいて除去した。総強度データは、各ウェルについての総強度を陽性対照についての平均総強度で除することにより正規化した。各複製セットについて、平均及び標準偏差用に正規化データを算出した。
【０３２９】
　表９は、様々な化合物及び増殖因子と低用量アクチビンＡとの異なる組み合わせについてのアッセイから得られた結果を示す。一部の化合物は、様々な増殖因子に対して強い相乗的な応答を示した。その他の場合、相乗効果はより穏やかなものであったが、低用量のアクチビンＡ対照と比較してその効果は有意なものであった。それ以外の化合物は、低用量アクチビンＡ対照と比べて活性を有さなかった。
【０３３０】
　（実施例１０）
　アクチビンＡ非存在下での、胚体内胚葉系のマーカーを発現している細胞への単一のヒト胚性幹細胞の分化に対する、本発明の化合物の効果
　アッセイのために酵素処理により単一の細胞へと分散させて単層で蒔いた細胞を用いるスクリーニングフォーマットでも、環式アニリン－ピリジノトリアジン化合物を試験した。低用量でも増殖因子をもたらし得る血清を除去するという変更をアッセイに加えた。これを受けて基本培地は交換し、血清は脂肪酸不含ＢＳＡと置き換えた。アッセイを４日間から３日間へと短縮して、結果を測定するための時間枠をより狭くした。最後に、アッセイには以前にアクチビンＡ非存在下での胚体内胚葉分化について有意であるが準最適な効果を示した２つの増殖因子、ＥＧＦ及びＦＧＦ４を含んだ。
【０３３１】
　スクリーニングアッセイ
　細胞アッセイ播種：簡潔に述べると、Ｈ１ヒト胚性幹細胞のクラスターを、ｇｒｏｗｔｈ　ｆａｃｔｏｒ－ｒｅｄｕｃｅｄ　ＭＡＴＲＩＧＥＬ（商標）（Ｉｎｖｉｔｒｏｇｅｎ；Ｃａｔ　＃　３５６２３１）をコートした組織培養プラスチック上で増殖させた。培養物は、１０cm^2の表面積あたり１０ｍＬの等量のＡｃｃｕｔａｓｅ（Ｓｉｇｍａ；Ｃａｔ　＃　Ａ６９６４）を用いて３７℃で５分間にわたって処理し、次いで穏やかに再懸濁し、遠心沈降によりペレット化し、計数のためにＭＥＦ馴化培地に再懸濁した。播種アッセイのために、ｇｒｏｗｔｈ　ｆａｃｔｏｒ－ｒｅｄｕｃｅｄ　ＭＡＴＲＩＧＥＬ（商標）をコートした９６ウェルブラックプレート（Ｐａｃｋａｒｄ　ＶｉｅｗＰｌａｔｅｓ；Ｃａｔ　＃６００５１８２）上に、１００μＬ／ウェルの用量を用いて、細胞を５０，０００細胞／cm^2で蒔いた。細胞を付着させ、８ｎｇ／ｍＬのｂＦＧＦ（Ｒ＆Ｄ　Ｓｙｓｔｅｍｓ；Ｃａｔ　＃　２３３－ＦＢ）を添加したＭＥＦ馴化培地を毎日供給しながら３～５日にわたって対数増殖期を回復させた。アッセイの持続時間の間、プレートは加湿したボックス中に３７℃、５％　CO_2で維持した。
【０３３２】
　化合物の調製及びアッセイ：ＥＧＦ及びＦＧＦ４の貯蔵品を９６ウェルポリプロピレンプレート（Ｃｏｒｎｉｎｇ，Ｉｎｃ．；Ｃａｔ　＃　３９６０）中に用意した。化合物２

２は１００％　ＤＭＳＯ（Ｓｉｇｍａ；Ｃａｔ　＃　Ｄ２６５０）に溶解させた５ｍＭ原液として利用可能なものであり、－８０℃で保存した。各ウェルから培養培地を吸引し、続いてＰＢＳで３回洗浄して残留増殖因子及び血清を除去することで、アッセイを開始した。２．５％脂肪酸不含ＢＳＡ（ＭＰ　Ｂｉｏｍｅｄｉｃａｌｓ　ＬＬＣ；Ｃａｔ　＃　１５２４０１）、１０ｎｇ／ｍＬのｂＦＧＦ（ＰｅｐｒｏＴｅｃｈ　Ｉｎｃ；Ｃａｔ　＃　１００－１８Ｂ）、２５ｎｇ／ｍＬのＷｎｔ３ａ（Ｒ＆Ｄ　Ｓｙｓｔｅｍｓ；Ｃａｔ　＃　１３２４－ＷＮ）及び３．１２５μＭ化合物２２に加えて２０μＬ増殖因子５ｘ原液を添加したＲＰＭＩ　１６４０基本培地（Ｉｎｖｉｔｒｏｇｅｎ；Ｃａｔ　＃　２２４００－０８９）を、１ウェルあたり８０μＬの試験量で加え、アッセイにおける最終濃度（２％脂肪酸不含ＢＳＡ、８ｎｇ／ｍＬのｂＦＧＦ（ＰｅｐｒｏＴｅｃｈ　Ｉｎｃ；Ｃａｔ　＃　１００－１８Ｂ）、２０ｎｇ／ｍＬのＷｎｔ３ａ、及び２．５μＭの化合物２２）を得た。陽性対照ウェルには、２％脂肪酸不含ＢＳＡ、８ｎｇ／ｍＬのｂＦＧＦ、２０ｎｇ／ｍＬのＷｎｔ３ａ及び１００ｎｇ／ｍＬヒト組換えアクチビンＡ（ＰｅｐｒｏＴｅｃｈ；Ｃａｔ　＃　１２０－１４）を添加した同様の基本培地を含有させた。陰性対照ウェルには、アクチビンＡに関する処理剤は除いて、２％脂肪酸不含ＢＳＡ、８ｎｇ／ｍＬのｂＦＧＦ、２０ｎｇ／ｍＬのＷｎｔ３ａを添加した同様の基本培地を含有させた。

【０３３３】

アッセイの２日目に、ウェルを再度吸引し、２．５％脂肪酸不含ＢＳＡ、１０ｎｇ／ｍＬのｂＦＧＦ、及び３．１２５μＭの化合物２２に加えて２０μＬの増殖因子の５ｘ原液を添加したＲＰＭＩ　１６４０基本培地を、１ウェルあたり８０μＬで加え、アッセイにおける最終濃度（２％脂肪酸不含ＢＳＡ、８ｎｇ／ｍＬのｂＦＧＦ及び２．５μＭの化合物２２）を得た。陽性対照ウェルには、２％脂肪酸不含ＢＳＡ、８ｎｇ／ｍＬのｂＦＧＦ、及び１００ｎｇ／ｍＬヒト組換えアクチビンＡを添加した同様の基本培地を含有させた。陰性対照サンプルには、アクチビンＡに関する処理剤は除いて、２％脂肪酸不含ＢＳＡ、及び８ｎｇ／ｍＬのｂＦＧＦを添加した同様の基本培地を含有させた。

【０３３４】

ハイコンテンツな解析：４日間の培養の最後に、アッセイプレートをＰＢＳで２回洗浄し、４％パラホルムアルデヒド（Ａｌｅｘｉｓ　Ｂｉｏｃｈｅｍｉｃａｌ；Ｃａｔ　＃　ＡＬＸ－３５０－０１１）で室温で２０分間にわたって固定し、次いでＰＢＳで３回洗浄し、０．５％　Ｔｒｉｔｏｎ　Ｘ－１００（Ｓｉｇｍａ；Ｃａｔ　＃　Ｔ８７６０－２）で室温で２０分間にわたって透過処理した。細胞を再度ＰＢＳで３回洗浄し、４％ニワトリ血清（Ｉｎｖｉｔｒｏｇｅｎ；Ｃａｔ　＃　１６１１００８２）のＰＢＳ溶液で、室温で３０分間にわたってブロッキング処理した。一次抗体（ヤギ抗ヒトＳＯＸ１７；Ｒ＆Ｄ　Ｓｙｓｔｅｍｓ；Ｃａｔ　＃　ＡＦ１９２４）を４％ニワトリ血清に１：１００で希釈し、室温で１時間各ウェルに加えた。Ａｌｅｘａ　Ｆｌｕｏｒ４　８８を結合させた二次抗体（ニワトリ抗ヤギＩｇＧ；Ｍｏｌｅｃｕｌａｒ　Ｐｒｏｂｅｓ；Ｃａｔ　＃　ＡＺ１４６７）をＰＢＳに１：２００で希釈し、ＰＢＳで３回洗浄したあとの各サンプルウェルに加えた。核を対比染色するために、４μｇ／ｍＬ　Ｈｏｅｃｈｓｔ　３３３４２（Ｉｎｖｉｔｒｏｇｅｎ；Ｃａｔ　＃　Ｈ３５７０）を室温で１０分間加えた。プレートをＰＢＳで１回洗浄し、撮像のために１００μＬ／ウェルのＰＢＳで残した。

【０３３５】

Ｈｏｅｃｈｓｔ　３３３４２とＡｌｅｘａ　Ｆｌｕｏｒ　４８８とで染色した細胞用に５１００８ｂｓダイクロイックを利用して、ＩＮ　Ｃｅｌｌ　Ａｎａｌｙｚｅｒ　１０００（ＧＥ　Ｈｅａｌｔｈｃａｒｅ）を用いて撮像を実施した。曝露時間は陽性対照ウェル及び二次抗体単独で染色した未処理陰性対照ウェルから最適化した。１ウェルあたり１５視野の撮像を得て、バイオアッセイ及び続く染色手順の間の任意の細胞ロスを補正した。ＩＮ　Ｃｅｌｌ　Ｄｅｖｅｌｏｐｅｒ　Ｔｏｏｌｂｏｘ　１．７（ＧＥ　Ｈｅａｌｔｈｃａｒｅ）ソフトウェアを用いて総細胞数及び総ＳＯＸ１７強度についての測定値を各ウェルから得た。核の分裂は、グレースケールレベル（ベースライン範囲１００～３００）と核の大きさに基づいて判定した。各複製データセットについて平均及び標準偏差を算出し

た。総ＳＯＸ１７タンパク質発現は、細胞面積によって乗じた細胞の総蛍光値として定義される総強度又は積分強度として記録した。バックグラウンドは、２００～３５００の間のグレースケール範囲の許容基準に基づいて除去した。総強度データは、各ウェルについての総強度を陽性対照についての平均総強度で除することにより正規化した。各複製セットについて、平均及び標準偏差用に正規化データを算出した。

【０３３６】

表１０には、化合物３４について本アッセイで得られた結果を示す。化合物３４を不含の、ＥＧＦ及び／又はＦＧＦ４単独での対照サンプルでは、ＳＯＸ１７発現は低かった。化合物３４の添加は、ＳＯＸ１７発現の有意な増加をもたらした。

【０３３７】

（実施例１１）

胚体内胚葉系に特徴的なマーカーを発現している細胞へのヒト胚性幹細胞の分化に対する、アクチビンＡ及びＧＤＦ－８の能力の比較

前述の実施例は、胚体内胚葉系に特徴的なマーカーを発現している細胞へのヒト胚性幹細胞の分化に対して、ＧＤＦ－８がアクチビンＡと置き換えられ得ることを示した。胚体内胚葉系に特徴的なマーカーを発現している細胞へのヒト胚性幹細胞の分化に対する、ＧＤＦ－８及びアクチビンＡのそれぞれの能力について作用強度を知ることは重要であった。胚性幹細胞分化時に得られる結果について比較するために、等濃度の各増殖因子を用いて用量応答アッセイを実施した。

【０３３８】

アッセイのための細胞の調製：ヒト胚性幹細胞（Ｈ１ヒト胚性幹細胞株）の保存培養物は、ｇｒｏｗｔｈ　ｆａｃｔｏｒ－ｒｅｄｕｃｅｄ　ＭＡＴＲＩＧＥＬでコートしたディッシュ上のＭＥＦ馴化培地中で、未分化の多能性状態のまま、平均して各４日ごとに継代しながら維持した。継代は、細胞培養物を１ｍｇ／ｍＬディスパーゼ（Ｉｎｖｉｔｒｏｇｅｎ，Ｃａｔ　＃：１７１０５－０４１）溶液に３７℃で５～７分間曝露して、続いて単層をＭＥＦ馴化培地ですすぎ、穏やかにかき取り、細胞クラスターを回収することにより実施した。クラスターを低速度で遠心して細胞ペレットを回収し、残留ディスパーゼを除去した。細胞クラスターはルーチン的な維持培養については１：３比又は１：４比で、あるいは直接アッセイについては１：１比で継代した。全てのヒト胚性幹細胞株は５０未満の継代数で維持し、正常な核表現型について及びマイコプラズマ汚染の非存在について、ルーチン的に評価した。

【０３３９】

本アッセイで使用した細胞クラスターは、８ｎｇ／ｍＬのｂＦＧＦを添加したＭＥＦ馴化培地に均一に再懸濁し、ｇｒｏｗｔｈ　ｆａｃｔｏｒ－ｒｅｄｕｃｅｄ　ＭＡＴＲＩＧＥＬ（商標）でコートした９６ウェルＰａｃｋａｒｄ　ＶＩＥＷＰＬＡＴＥＳ（ＰｅｒｋｉｎＥｌｍｅｒ；Ｃａｔ　＃　６００５１８２）上に１００μＬ／ウェルの用量を播種した。８ｎｇ／ｍＬのｂＦＧＦを添加したＭＥＦ馴化培地を最初の蒔き込み及び増殖に使用した。使用した培養培地を各ウェルから吸引し、等量の新鮮な培地と交換することで毎日の培地供給を実施した。アッセイの持続時間の間、プレートは加湿したボックス中に３７℃、５％　CO_2で維持した。

【０３４０】

アッセイ：各ウェルから培養培地を吸引し、試験培地のアリコート（１００μＬ）を加えて戻すことでアッセイを開始した。１日目と２日目に各ウェルから培地を吸引し、新鮮な試験培地と交換することで培地供給しながら、４つ組複製で、全部で３日間のアッセイ期間にわたる試験条件を実施した。２つの１２－ｃｈａｎｎｅｌ　ｐｏｌｙｐｒｏｐｙｌｅｎｅ　ｂａｓｉｎｓ（Ａｒｇｏｓ　ｔｅｃｈｎｏｌｏｇｉｅｓ，Ｉｎｃ，Ｃａｔ　＃：Ｂ３１３５）を使用して、異なる濃度のアクチビンＡ（ＰｅｐｒｏＴｅｃｈ；Ｃａｔ　＃１２０－１４）又はＧＤＦ－８（Ｒ＆Ｄ　Ｓｙｓｔｅｍｓ，Ｃａｔ　＃　７８８－Ｇ８）を含有する試験培地を作製した。２～１２の番号が付与された各ｂａｓｉｎのチャンネルには、２％ウシ血清アルブミンフラクションＶ、脂肪酸不含（ＦＡＦ　ＢＳＡ）（ＭＰ

Ｂｉｏｍｅｄｉｃａｌｓ，Ｉｎｃ；Ｃａｔ　＃　１５２４０１）及び８ｎｇ／ｍＬのｂＦＧＦ（ＰｅｐｒｏＴｅｃｈ　Ｉｎｃ．；Ｃａｔ　＃：１００－１８Ｂ）を添加したＲＰＭＩ－１６４０培地（Ｉｎｖｉｔｒｏｇｅｎ；Ｃａｔ　＃：２２４００）から構成されるアッセイ培地を１ｍＬ含有させ、２日目と３日目は除き、１日目に２０ｎｇ／ｍＬのＷｎｔ３ａ（Ｒ＆Ｄ　Ｓｙｓｔｅｍｓ；Ｃａｔ　＃　１３２４－ＷＮ／ＣＦ）を添加した。各ｂａｓｉｎのチャンネル番号１には、同様のアッセイ培地に希釈した１６００ｎｇ／ｍＬのアクチビンＡ又は１６００ｎｇ／ｍＬＧＤＦ－８を含有させた。１ｍＬの培地をチャンネル番号１からチャンネル番号２へと移し、よく混合した。未使用のピペットチップを使用して、１ｍＬの培地をチャンネル番号２からチャンネル番号３へと移し、続いて徹底的に混合した。各対応のｂａｓｉｎに対して、チャンネル番号１１まで同じ手順を順番に繰り返した。各ｂａｓｉｎのチャネル番号１２には、アクチビンＡ又はＧＤＦ－８を不含の培地を含有させた。それぞれのアッセイウェルに添加するために、この操作により、アクチビンＡ又はＧＤＦ－８を１．６ｎｇ／ｍＬ～１６００ｎｇ／ｍＬの範囲の濃度で含有している、一連の２倍段階希釈試験溶液を作製した。

【０３４１】

ハイコンテンツな解析：３日間の培養の最後に、アッセイプレートをＰＢＳ（Ｉｎｖｉｔｒｏｇｅｎ；Ｃａｔ　＃　１４１９０）で１回洗浄し、４％パラホルムアルデヒド（Ａｌｅｘｉｓ　Ｂｉｏｃｈｅｍｉｃａｌ；Ｃａｔ　＃　ＡＬＸ－３５０－０１１）で室温で２０分間にわたって固定し、次いでＰＢＳで３回洗浄し、０．５％　Ｔｒｉｔｏｎ　Ｘ－１００（Ｓｉｇｍａ；Ｃａｔ　＃　Ｔ８７６０－２）で室温で２０分間にわたって透過処理した。細胞を再度ＰＢＳで３回洗浄し、４％ニワトリ血清（Ｉｎｖｉｔｒｏｇｅｎ；Ｃａｔ　＃　１６１１００８２）のＰＢＳ溶液で、室温で３０分間にわたってブロッキング処理した。一次抗体（ヤギ抗ヒトＳＯＸ１７；Ｒ＆Ｄ　Ｓｙｓｔｅｍｓ；Ｃａｔ　＃　ＡＦ１９２４）を４％ニワトリ血清に１：１００で希釈し、室温で２時間各ウェルに加えた。ＰＢＳでの３回の洗浄のあと、Ａｌｅｘａ　Ｆｌｕｏｒ　４８８を結合させた二次抗体（ニワトリ抗ヤギＩｇＧ；Ｉｎｖｉｔｒｏｇｅｎ；Ｃａｔ　＃Ａ２１４６７）をＰＢＳに１：２００希釈したものを各ウェルに加えた。核を対比染色するために、５μｇ／ｍＬ　Ｈｏｅｃｈｓｔ　３３３４２（Ｉｎｖｉｔｒｏｇｅｎ；Ｃａｔ　＃　Ｈ３５７０）を室温で１５分間加えた。プレートをＰＢＳで１回洗浄し、撮像のために１００μＬ／ウェルのＰＢＳで残した。

【０３４２】

Ｈｏｅｃｈｓｔ　３３３４２とＡｌｅｘａ　Ｆｌｕｏｒ　４８８とで染色した細胞用に５１００８ｂｓダイクロイックを利用して、ＩＮ　Ｃｅｌｌ　Ａｎａｌｙｚｅｒ　１０００（ＧＥ　Ｈｅａｌｔｈｃａｒｅ）を用いて撮像を実施した。１ウェルあたり２５視野から撮像を得た。ＩＮ　Ｃｅｌｌ　Ｄｅｖｅｌｏｐｅｒ　Ｔｏｏｌｂｏｘ　１．７（ＧＥ　Ｈｅａｌｔｈｃａｒｅ）ソフトウェアを使用して、各ウェルの総ＳＯＸ１７強度についての測定値を得た。核の分裂は、グレースケールレベル（ベースライン範囲１００～３００）と核の大きさに基づいて判定した。各４つ組複製データセットについて平均及び標準偏差を算出した。総ＳＯＸ１７タンパク質発現は、細胞面積によって乗じた細胞の総蛍光値として定義される総強度又は積分強度として記録した。バックグラウンドは、２００～４５００の間のグレースケール範囲の許容基準に基づいて除去した。ＧｒａｐｈＰａｄ　Ｐｒｉｓｍ　４．０２（ＧｒａｐｈＰａｄ　Ｓｏｆｔｗａｒｅ，Ｉｎｃ．，Ｌｏ　Ｊｏｌｌａ，ＣＡ）を用いて総ＳＯＸ１７強度データを算出した。データは正規化して、各データセット中の最も小さな値ともっとも大きな値をそれぞれ０％及び１００％と定義した。表１１は、アクチビンＡ及びＧＤＦ－８のデータセットのそれぞれについて正規化した値を示す。表１１に示す正規化した値を用いて作成したものとして、２つのＳ字型の用量反応曲線を図２に示す。曲線適合を示すR^2値を、ＧｒａｐｈＰａｄ　Ｐｒｉｓｍを用いて算出したところ、アクチビンＡは０．９９４４であり、ＧＤＦ－８は０．９９６４であると判定された。ＧｒａｐｈＰａｄ　Ｐｒｉｓｍを用いて各増殖因子のEC_{50}値を算出したところ、アクチビンＡは１３．９ｎｇ／ｍＬであり、ＧＤＦ－８は１８４．８ｎｇ／ｍＬで

あると判定された。これらのデータは、ヒト胚性幹細胞に胚体内胚葉系に特徴的なマーカーを発現している細胞への分化を誘導するという点について、ＧＤＦ－８はアクチビンＡと比べて強力さに劣るということを示す。それでもなおＧＤＦ－８はアクチビンＡと代替可能であり、特定の濃度では、ＳＯＸ１７発現で示されるような胚体内胚葉細胞の同等の集団を誘導することができる。

【０３４３】

（実施例１２）

膵内分泌腺系に特徴的なマーカーを発現している細胞への更なる分化を可能にする本発明の方法に従い作製された、胚体内胚葉系に特徴的なマーカーを発現している細胞

ヒト胚性幹細胞の並行集合を、化合物３４又は化合物５６のいずれかと組み合わせたＧＤＦ－８を用いて、胚体内胚葉系に特徴的なマーカーを発現している細胞へと分化させた。したがって、処理細胞に段階的分化プロトコルを適用して、膵臓内胚葉及び内分泌腺系に向かう分化を促進させた。アクチビンＡ及びＷｎｔ３ａで処理した細胞から構成される並行対照を、段階的な分化プロセスによって比較目的で維持した。分化の様々なステージの代表的なタンパク質及びｍＲＮＡバイオマーカーの状況を判定するために、分化の各ステージごとにサンプルを採取した。

【０３４４】

アッセイのための細胞の調製：ヒト胚性幹細胞（Ｈ１ヒト胚性幹細胞株）の保存培養物は、ｇｒｏｗｔｈ　ｆａｃｔｏｒ－ｒｅｄｕｃｅｄ　ＭＡＴＲＩＧＥＬ（商標）でコートしたディッシュ上のＭＥＦ馴化培地中で、未分化の多能性状態のまま、平均して各４日ごとに継代しながら維持した。継代は、細胞培養物を１ｍｇ／ｍＬディスパーゼ（Ｉｎｖｉｔｒｏｇｅｎ；Ｃａｔ　＃　１７１０５－０４１）溶液に３７℃で５～７分間曝露して、続いて単層をＭＥＦ馴化培地ですすぎ、穏やかにかき取り、細胞クラスターを回収することにより実施した。クラスターを低速度で遠心して細胞ペレットを回収し、残留ディスパーゼを除去した。細胞クラスターはルーチン的な維持培養については１：３比又は１：４比で、あるいは直接アッセイについては１：１比で継代した。全てのヒトＥＳ細胞株は５０未満の継代数で維持し、正常な核型について及びマイコプラズマの非存在について、ルーチン的に評価した。

【０３４５】

細胞クラスターは、８ｎｇ／ｍＬのｂＦＧＦを添加したＭＥＦ馴化培地に均一に再懸濁して、ｇｒｏｗｔｈ　ｆａｃｔｏｒ－ｒｅｄｕｃｅｄ　ＭＡＴＲＩＧＥＬ（商標）をコートした２４ウェルのブラックウォール培養プレート（Ａｒｃｔｉｃ　Ｗｈｉｔｅ；Ｃａｔ　＃　ＡＷＬＳ－３０３０１２）上に０．５ｍＬ／ウェルの用量を播種した。使用した培養培地を各ウェルから吸引し、等量の新鮮な培地と交換することで毎日の培地供給を実施した。アッセイの持続時間の間、プレートは３７℃、５％　CO_2で維持した。

【０３４６】

アッセイ：各ウェルから培養培地を吸引し、試験培地のアリコート（０．５ｍＬ）を加えて戻すことでアッセイを開始した。培地を各ウェルから吸引し、新鮮な試験培地と交換することにより毎日培地供給しながら、分化の第１工程のための試験条件を３日間の期間にわたって実施した。１％ウシ血清アルブミンフラクションＶ、脂肪酸不含（ＦＡＦ　ＢＳＡ）（ＭＰ　Ｂｉｏｍｅｄｉｃａｌｓ，Ｉｎｃ；Ｃａｔ　＃　１５２４０１）、１％　Ｐｒｏｂｕｍｉｎ（Ｍｉｌｌｉｐｏｒｅ；Ｃａｔ　＃　HYPERLINK "http://www.millipore.com/catalogue/item/81-068-3" ８１－０６８－３）、及び２０ｎｇ／ｍＬのＷｎｔ３ａ（Ｒ＆Ｄ　Ｓｙｓｔｅｍｓ；Ｃａｔ　＃　１３２４－ＷＮ／ＣＦ）を添加したＲＰＭＩ－１６４０培地（Ｉｎｖｉｔｒｏｇｅｎ；Ｃａｔ　＃　２２４００）中に各増殖因子を希釈したそれぞれのアッセイウェルに、アッセイの初日に１００ｎｇ／ｍＬのアクチビンＡ（ＰｅｐｒｏＴｅｃｈ；Ｃａｔ　＃１２０－１４）又は２００ｎｇ／ｍＬのＧＤＦ－８（Ｒ＆Ｄ　Ｓｙｓｔｅｍｓ，Ｃａｔ　＃　７８８－Ｇ８）を加えた。アッセイの二日目に、２％　ＦＡＦ　ＢＳＡを添加した、Ｗｎｔ３ａは不含のＲＰＭＩ－１６４０培地中に、１００ｎｇ／ｍＬのアクチビンＡ又は２００ｎｇ／ｍＬのＧＤＦ－８を希釈した。ＧＤＦ－

８を用いる一部の試験サンプルでは、Ｗｎｔ３ａを２．５μＭの濃度の化合物３４又は化合物５６のいずれかに置き換え、かつ化合物３４又は化合物５６のいずれかを、胚体内胚葉分化の全３日間にわたって毎日加えた。分化の第１工程の終了時に、細胞を一部のウェルからフローサイトメトリー解析のために回収し、胚体内胚葉形成のマーカーであるＣＸＣＲ４のレベルを評価した。更にウェルをＲＴ－ＰＣＲ解析のために回収し、分化についての他のマーカーを測定した。

【０３４７】

分化の第１工程の最後に、各処理群からの並行ウェルの複製セットに更なる段階的な分化を施した。第一分化工程の後に、全てのウェルが継続して培養され、同様の処理による分化を受けたことを注記しておく必要がある。この連続的な分化のためのプロトコルを以下に記載する。

【０３４８】

分化プロトコルの工程２を二日間にわたって実施した。各ウェルから培地を吸引し、２％ウシ血清アルブミンフラクションＶ、脂肪酸不含（ＦＡＦ　ＢＳＡ）（ＭＰ　Ｂｉｏｍｅｄｉｃａｌｓ，Ｉｎｃ；Ｃａｔ　＃　１５２４０１）、５０ｎｇ／ｍＬのＦＧＦ７（ＰｅｐｒｏＴｅｃｈ；Ｃａｔ　＃　１００－１９）、及び２５０ｎＭシクロパミン（Ｃａｌｂｉｏｃｈｅｍ；Ｃａｔ　＃　２３９８０４）を含有しているＤＭＥＭ：Ｆ１２培地（Ｉｎｖｉｔｒｏｇｅｎ；Ｃａｔ　＃　１１３３０－０３２）の新鮮なアリコート（０．５ｍＬ）と交換することで、細胞に毎日培地供給した。

【０３４９】

分化プロトコルの工程３を四日間にわたって実施した。各ウェルから培地を吸引し、１％Ｂ２７（Ｉｎｖｉｔｒｏｇｅｎ；Ｃａｔ　＃　１７５０４－０４４）、５０ｎｇ／ｍＬのＦＧＦ７、１００ｎｇ／ｍＬのノギン（Ｒ＆Ｄ　Ｓｙｓｔｅｍｓ；Ｃａｔ　＃　３３４４－ＮＧ）、２５０ｎＭのＫＡＡＤ－シクロパミン（Ｃａｌｂｉｏｃｈｅｍ；Ｃａｔ　＃　２３９８０４）、及び２μＭのオールトランスレチノイン酸（ＲＡ）（Ｓｉｇｍａ－Ａｌｄｒｉｃｈ；Ｃａｔ　＃　Ｒ２６２５）を添加したＤＭＥＭ－高グルコース（Ｉｎｖｉｔｒｏｇｅｎ；Ｃａｔ　＃　１０５６９）の新鮮なアリコート（０．５ｍＬ）と交換することで、細胞に毎日培地供給した。分化の第３工程の最後に、ＲＴ－ＰＣＲによる解析のために一部のウェルから細胞を回収し、分化マーカーを測定した。他の培養ウェルでは、膵臓内胚葉に関連付けられる転写因子であるＰｄｘ１、及び腸管内胚葉に関連付けられる転写因子であるＣｄｘ２の、タンパク質発現レベルについて、ハイコンテンツな画像解析を実施した。

【０３５０】

分化プロトコルの工程４を三日間にわたって実施した。各ウェルから培地を吸引し、１％のＢ２７、１００ｎｇ／ｍＬのノギン、１００ｎｇ／ｍＬネトリン－４、１μＭ　ＤＡＰＴ（ＥＭＤ　Ｂｉｏｓｃｉｅｎｃｅｓ；Ｃａｔ　＃５６５７７０）、及び１μＭ　Ａｌｋ５インヒビター（Ａｘｘｏｒａ；Ｃａｔ　＃　ＡＬＸ－２７０－４４５）を添加したＤＭＥＭ－高グルコースの新鮮なアリコート（０．５ｍＬ）と交換することで、細胞に毎日新鮮なアリコートを供給した。分化の第４工程の終了時に、ＲＴ－ＰＣＲによる解析のために一部のウェルから細胞を回収し、分化マーカーを測定した。他の培養ウェルに対しては、ＰＤＸ１のタンパク質発現レベルについて、ハイコンテンツな画像解析を実施した。

【０３５１】

分化プロトコルの工程５を、１％のＢ２７及び１μＭ　Ａｌｋ５インヒビターを添加したＤＭＥＭ－高グルコースで７日間にわたって実施した。毎日各ウェル中の培地を吸引し、新鮮なアリコート（０．５ｍＬ）で交換した。分化の第５工程の終了時に、ＲＴ－ＰＣＲによる解析のために一部のウェルから細胞を回収し、分化マーカーを測定した。他の培養ウェルには、インスリン及びグルカゴンのタンパク質発現レベルについてのハイコンテンツな画像解析を実施した。

【０３５２】

分化プロトコルの工程６を、１％のＢ２７を添加したＤＭＥＭ－高グルコースで７日間

にわたって実施した。一日おきに各ウェル中の培地を吸引し、新鮮なアリコート（０．５ｍＬ）に交換した。分化の第６工程の終了時に、ＲＴ－ＰＣＲによる解析のために一部のウェルから細胞を回収し、分化マーカーを測定した。

【０３５３】

ＦＡＣＳ解析：０．５％ヒトγ－グロブリン（Ｓｉｇｍａ；Ｃａｔ＃　Ｇ－４３８６）のＰＢＳ（Ｉｎｖｉｔｒｏｇｅｎ；Ｃａｔ　＃　１４０４０－１３３）溶液とＢＤ　ＦＡＣＳ染色バッファー－ＢＳＡ（ＢＤ；Ｃａｔ　＃５５４６５７）との１：５溶液で、ＦＡＣＳ解析用の細胞を４℃で１５分間にわたってブロッキングした。次いでＣＤ９ＰＥ（ＢＤ；Ｃａｔ　＃　５５５３７２）、ＣＤ９９ＰＥ（Ｃａｌｔａｇ；Ｃａｔ　＃　ＭＨＣＤ９９０４）及びＣＸＣＲ４　ＡＰＣ（Ｒ＆Ｄ　Ｓｙｓｔｅｍｓ；Ｃａｔ＃　ＦＡＢ１７３Ａ）に対する抗体で、細胞を４℃で３０分間にわたって染色した。ＢＤ　ＦＡＣＳ染色バッファでの一連の洗浄の後、生死判別のため細胞を７－ＡＡＤ（ＢＤ；Ｃａｔ　＃　５５９９２５）で染色し、ＢＤ　ＦＡＣＳ解析を実施した。ＰＥ及びＡＰＣの両方に対するマウスＩｇＧ１Ｋアイソタイプ対照抗体を、陽性細胞パーセントを得る（gate）ために使用した。

【０３５４】

ＲＴ－ＰＣＲ解析：ＲＮＡサンプルを、エタノールを含有している高塩濃度緩衝液の存在下で、シリカゲル膜（Ｒｎｅａｓｙ　Ｍｉｎｉ　Ｋｉｔ，Ｑｉａｇｅｎ，ＣＡ）に結合させた後、洗浄して混入物を除去することにより精製した。ＲＮＡをＴＵＲＢＯ　ＤＮＡ－フリーキット（Ａｍｂｉｏｎ，ＩＮＣ）を使用して更に精製し、次いで高品質ＲＮＡを水中に溶出させた。収率及び純度は分光光度計でのＡ２６０及びＡ２８０の測定値により評価した。ＡＢＩ（ＡＢＩ，ＣＡ）のｈｉｇｈ　ｃａｐａｃｉｔｙ　ｃＤＮＡ　ａｒｃｈｉｖｅ　ｋｉｔを使用して、精製したＲＮＡからＣＤＮＡコピーを作成した。

【０３５５】

特に記載のない限り、全試薬はＡｐｐｌｉｅｄ　Ｂｉｏｓｙｓｔｅｍｓから購入した。ＡＢＩ　ＰＲＩＳＭ（登録商標）７９００配列検出システムを使用して、リアルタイムＰＣＲ反応を行った。２０ｎｇの逆転写ＲＮＡと共に、ＴＡＱＭＡＮ（登録商標）ＵＮＩＶＥＲＳＡＬ　ＰＣＲ　ＭＡＳＴＥＲ　ＭＩＸ（登録商標）（ＡＢＩ，ＣＡ）を、２０μＬの全反応容量で使用した。各ｃＤＮＡサンプルは２つ組複製で実施して、ピペッティング誤差を補正した。プライマー及びＦＡＭ－標識ＴＡＱＭＡＮ（登録商標）プローブを２００ｎＭの濃度で使用した。各標的遺伝子に関する発現レベルを、以前にＡｐｐｌｉｅｄ　Ｂｉｏｓｙｓｔｅｍｓにより開発されたヒトグリセルアルデヒド－３－リン酸デヒドロゲナーゼ（ＧＡＰＤＨ）内在性対照を使用して正規化した。プライマーセット及びプローブセットは表１２に一覧にしてある。最初に５０℃で２分間、次いで９５℃で１０分間インキュベーションした後、サンプルを、９５℃で１５秒間の変性工程と、その後の６０℃で１分間のアニーリング／伸長工程の２段階に４０サイクルかけた。ＧＥＮＥＡＭＰ（登録商標）７０００配列検出システムソフトウエアを使用して、データ解析を行った。各プライマー／プローブセットについて、増幅の指数関数領域の中央において蛍光強度が特定の値に到達したサイクル数としてのＣｔ値を決定した。比較Ｃｔ法を使用して、相対的な遺伝子発現レベルを算出した。簡潔に述べると、各ｃＤＮＡサンプルに関して、対象とする遺伝子のＣｔ値から内在性対照のＣｔ値を減算して、デルタＣｔ値（ΔＣｔ）を得た。増幅は１００％効率であると仮定し、正規化した標的量を２－ΔＣｔとして算出した。最終的なデータを、標準物質サンプルに関して表した。

【０３５６】

ハイコンテンツな解析：培養の最後に、アッセイプレートをＰＢＳ（Ｉｎｖｉｔｒｏｇｅｎ；Ｃａｔ　＃　１４１９０）で１回洗浄し、４％パラホルムアルデヒド（Ａｌｅｘｉｓ　Ｂｉｏｃｈｅｍｉｃａｌ；Ｃａｔ　＃　ＡＬＸ－３５０－０１１）で室温で２０分間にわたって固定し、次いでＰＢＳで３回洗浄し、０．５％　Ｔｒｉｔｏｎ　Ｘ－１００（Ｓｉｇｍａ；Ｃａｔ　＃　Ｔ８７６０－２）で室温で２０分間にわたって透過処理した。細胞を再度ＰＢＳで３回洗浄し、４％ニワトリ血清（Ｉｎｖｉｔｒｏｇｅｎ；Ｃａｔ　＃

１６１１００８２）のＰＢＳ溶液で、室温で３０分間にわたってブロッキング処理した。一次抗体（ヤギ抗ヒトＳＯＸ１７；Ｒ＆Ｄ　Ｓｙｓｔｅｍｓ；Ｃａｔ　＃　ＡＦ１９２４）を４％ニワトリ血清に１：１００で希釈し、室温で２時間各ウェルに加えた。ＰＢＳでの３回の洗浄のあと、Ａｌｅｘａ　Ｆｌｕｏｒ　４８８を結合させた二次抗体（ニワトリ抗ヤギＩｇＧ；Ｉｎｖｉｔｒｏｇｅｎ；Ｃａｔ　＃Ａ２１４６７）をＰＢＳに１：２００希釈したものを各ウェルに加えた。核を対比染色するために、５μｇ／ｍＬ　Ｈｏｅｃｈｓｔ　３３３４２（Ｉｎｖｉｔｒｏｇｅｎ；Ｃａｔ　＃　Ｈ３５７０）を室温で１５分間加えた。プレートをＰＢＳで１回洗浄し、撮像のために１００μＬ／ウェルのＰＢＳで残した。解析のために使用した他の一次抗体には、１：１００希釈マウス抗ヒトＣＤＸ２（Ｉｎｖｉｔｒｏｇｅｎ；Ｃａｔ　＃　３９７８００）、１：１００希釈ヤギ抗ヒトＰｄｘ１（Ｓａｎｔａ　Ｃｒｕｚ　Ｂｉｏｔｅｃｈｎｏｌｏｇｙ；Ｃａｔ　＃　ＳＣ－１４６６４）、１：２００希釈ウサギ抗ヒトインスリン（Ｃｅｌｌ　Ｓｉｇｎａｌｉｎｇ；Ｃａｔ　＃　Ｃ２７Ｃ９）、及び１：１５００希釈マウス抗ヒトグルカゴン（Ｓｉｇｍａ－Ａｌｄｒｉｃｈ；Ｃａｔ　＃　Ｇ２６５４）が含まれた。解析のために使用した二次抗体には、１：４００希釈Ａｌｅｘａ　Ｆｌｕｏｒ　６４７ニワトリ抗マウスＩｇＧ（Ｉｎｖｉｔｒｏｇｅｎ；Ｃａｔ　＃　Ａ－２１４６３）、１：２００希釈Ａｌｅｘａ　Ｆｌｕｏｒ　４８８ロバ抗ヤギＩｇＧ（Ｉｎｖｉｔｒｏｇｅｎ；Ｃａｔ　＃　Ａ１１０５５）、１：１０００希釈Ａｌｅｘａ　Ｆｌｕｏｒ　６４７ニワトリ抗ウサギＩｇＧ（Ｉｎｖｉｔｒｏｇｅｎ；Ｃａｔ　＃　Ａ２１４４３）、及び１：１０００希釈Ａｌｅｘａ　Ｆｌｕｏｒ　４８８ニワトリ抗マウスＩｇＧ（Ｉｎｖｉｔｒｏｇｅｎ；Ｃａｔ　＃　Ａ２１２００）が含まれた。

【０３５７】

Ｈｏｅｃｈｓｔ　３３３４２とＡｌｅｘａ　Ｆｌｕｏｒ　４８８とで染色した細胞用に５１００８ｂｓダイクロイックを利用して、ＩＮ　Ｃｅｌｌ　Ａｎａｌｙｚｅｒ　１０００（ＧＥ　Ｈｅａｌｔｈｃａｒｅ）を用いて撮像を実施した。１ウェルあたり２５視野から撮像を得た。ＩＮ　Ｃｅｌｌ　Ｄｅｖｅｌｏｐｅｒ　Ｔｏｏｌｂｏｘ　１．７（ＧＥ　Ｈｅａｌｔｈｃａｒｅ）ソフトウェアを用いて総強度についての測定値を各ウェルから得た。核の分裂は、グレースケールレベル（ベースライン範囲１００～３００）と核の大きさに基づいて判定した。各複製データセットについて平均及び標準偏差を算出した。総タンパク質発現は、細胞面積によって乗じた細胞の総蛍光値として定義される総強度又は積分強度として記録した。バックグラウンドは、２００～４５００の間のグレースケール範囲の許容基準に基づいて除去した。総強度データは、各ウェルについての総強度を陽性対照についての平均総強度で除することにより正規化した。

【０３５８】

代表的な分化マーカーについてのＰＣＲの結果を、分化の各工程から回収した細胞について表１３に示す。ＧＤＦ－８とＷｎｔ３ａで処理するかあるいは、ＧＤＦ－８と化合物３４又はＧＤＦ－８と化合物５６のいずれかで処理したサンプルは同様の結果を示し、あるいは場合によっては内胚葉分化及び内分泌腺分化に関連付けられる発現マーカーの発現レベルの改善を示した。

【０３５９】

図３はＦＡＣＳ解析の結果を示し、分化の第１工程後の、胚体内胚葉マーカー（ＣＸＣＲ４）の発現を示す。ＧＤＦ－８とＷｎｔ３ａでのヒト胚性幹細胞の処理は、アクチビンＡとＷｎｔ３ａでの処理と比較して、ＣＸＣＲ４陽性細胞に関して同等の百分率を生み出した。同様にして、ＧＤＦ－８と低分子（化合物３４又は化合物５６）でのヒト胚性幹細胞の処理も、ＣＸＣ４陽性細胞に関して同等であるかわずかに高い百分率を生み出した。図４は胚体内胚葉への３日間の分化後のヒト胚性幹細胞における正規化ＳＯＸ１７タンパク質発現についてのハイコンテンツな画像解析を示す。ＧＤＦ－８とＷｎｔ３ａ又はＧＤＦ－８と低分子を使用した処理群の発現レベルは、アクチビンＡ及びＷｎｔ３ａで処理したものと同様である。

【０３６０】

図５は膵臓内胚葉への分化の第３工程後のヒト胚性幹細胞における正規化Ｐｄｘ１及びＣｄｘ２タンパク質発現についてのハイコンテンツな画像解析を示す。ＧＤＦ－８とＷｎｔ３ａ、又はＧＤＦ－８とＷｎｔ３ａ、又はＧＤＦ－８と本発明の化合物、を用いた処理群のレベルは、ＰＤＸ１及びＣＤＸ２について同レベルを示す。一部の処理群では、分化後に保持された細胞数が減少したことから、ＰＤＸ１を発現している細胞の比率は増加している。図６に示されるような分化の第４工程の後で、全ての処理群で、同等の正規化ＰＤＸ１発現量を示す同様の結果が得られた。図７は、インスリン及びグルカゴンの正規化タンパク質レベルを示し、アクチビンＡ処理群及びＧＤＦ－８処理群間の同等の発現を立証している。

【０３６１】

これらの集積された結果は、Ｗｎｔ３ａと、又は化合物３４若しくは化合物５６と組み合わせたＧＤＦ－８は、胚体内胚葉分化、並びにそれに続く膵臓内胚葉分化及び内分泌腺分化時にアクチビンＡと代替し得ることを立証する。

【０３６２】

（実施例１３）

タンパク質のＧＤＦファミリーのその他のメンバーによる、胚体内胚葉系に特徴的なマーカーを発現している細胞の形成

ヒト胚性幹細胞をその他のＧＤＦファミリーメンバーで処理した場合に胚体内胚葉系に特徴的なマーカーを発現している細胞を形成し得るかを判定することは重要であった。化合物３４若しくは化合物５６のいずれかと組み合わせたＷｎｔ３ａを６種類の異なるＧＤＦ増殖因子［ＧＤＦ－３、ＧＤＦ－５、ＧＤＦ－８、ＧＤＦ－１０、ＧＤＦ－１１、及びＧＤＦ－１５］と組み合わせてヒト胚性幹細胞で試験し、タンパク質のＧＤＦファミリーメンバーの、ヒト胚性幹細胞を胚体内胚葉系に特徴的なマーカーを発現している細胞へと分化させる能力について判定した。アクチビンＡ及びＷｎｔ３ａで処理した細胞についての並行対照を、比較目的で維持した。

【０３６３】

アッセイのための細胞の調製：ヒト胚性幹細胞（Ｈ１ヒト胚性幹細胞株）の保存培養物は、ｇｒｏｗｔｈ　ｆａｃｔｏｒ－ｒｅｄｕｃｅｄ　ＭＡＴＲＩＧＥＬ（商標）（ＢＤ　Ｂｉｏｓｃｉｅｎｃｅｓ；Ｃａｔ　＃　３５６２３１）でコートしたディッシュ上のＭＥＦ馴化培地中で、未分化の多能性状態のまま、平均して各４日ごとに継代しながら維持した。継代は、細胞培養物を１ｍｇ／ｍＬディスパーゼ（Ｉｎｖｉｔｒｏｇｅｎ；Ｃａｔ　＃　１７１０５－０４１）溶液に３７℃で５～７分間曝露して、続いて単層をＭＥＦ馴化培地ですすぎ、穏やかにかき取り、細胞クラスターを回収することにより実施した。クラスターを低速度で遠心して細胞ペレットを回収し、残留ディスパーゼを除去した。細胞クラスターはルーチン的な維持培養については１：３比又は１：４比で、あるいは直接アッセイについては１：１比で継代した。全てのヒトＥＳ細胞株は５０未満の継代数で維持し、正常な核型について及びマイコプラズマの非存在について、ルーチン的に評価した。

【０３６４】

細胞クラスターは、８ｎｇ／ｍＬのｂＦＧＦを添加したＭＥＦ馴化培地に均一に再懸濁して、ｇｒｏｗｔｈ　ｆａｃｔｏｒ－ｒｅｄｕｃｅｄ　ＭＡＴＲＩＧＥＬ（商標）をコートした９６ウェルＰａｃｋａｒｄ　ＶＩＥＷＰＬＡＴＥＳ（ＰｅｒｋｉｎＥｌｍｅｒ；Ｃａｔ　＃　６００５１８２）上に０．１ｍＬ／ウェルの用量を播種した。使用した培養培地を各ウェルから吸引し、等量の新鮮な培地と交換することで毎日の供給を実施した。アッセイの持続時間の間、プレートは３７℃、５％　CO_2で維持した。

【０３６５】

アッセイ：各ウェルから培養培地を吸引し、試験培地のアリコート（１００μＬ）を加えて戻すことでアッセイを開始した。１日目と３日目に各ウェルから培地を吸引し、新鮮な試験培地と交換することで培地供給しながら、３つ組複製で、全部で４日間のアッセイ期間にわたる試験条件を実施した。タンパク質のＧＤＦファミリーの様々なメンバーを、以下のように試験用に得た：ＧＤＦ－３（ＰｅｐｒｏＴｅｃｈ；Ｃａｔ　＃　１２０－２

2）；ＧＤＦ－５（ＤｅＰｕｙ　Ｏｒｔｈｏｐａｅｄｉｃｓ，Ｉｎｃ．，ａ　Ｊｏｈｎｓｏｎ＆Ｊｏｈｎｓｏｎ　ｃｏｍｐａｎｙ）；ＧＤＦ－８（Ｒ＆Ｄ　Ｓｙｓｔｅｍｓ；Ｃａｔ　＃　７８８－Ｇ８）；ＧＤＦ－１０（Ｒ＆Ｄ　Ｓｙｓｔｅｍｓ；Ｃａｔ＃１５４３－ＢＰ）；ＧＤＦ１１（ＰｅｐｒｏＴｅｃｈ；Ｃａｔ　＃　１２０－１１）；ＧＤＦ－１５（Ｒ＆Ｄ　Ｓｙｓｔｅｍｓ；Ｃａｔ　＃　９５７－ＧＤ）。ＤＭＥＭ：Ｆ１２培地（Ｉｎｖｉｔｒｏｇｅｎ；Ｃａｔ　＃　１１３３０－０３２）に０．５％ウシ胎児血清（Ｈｙｃｌｏｎｅ；Ｃａｔ　＃　ＳＨ３００７０．０３）を添加した基本培地のアリコート（８０μＬ）を、アッセイの初日に全てのウェルに加えた。一連の５つの異なる対照又は実験用試験サンプルを、アクチビンＡを評価するために、あるいは様々なＷｎｔ３ａを又は化合物３４若しくは化合物５６と組み合わせたＧＤＦを評価するために作製した。適切に一致させたアッセイウェルにこれらの試験サンプルの２０μＬアリコート（５ｘ濃縮品）を加えることで、１００μＬの最終アッセイ用量を記載の最終アッセイ条件で各ウェル中に作製した。対照試料の第１セットでは以下の条件を試験した：１）添加剤不含（即ち、添加性の増殖因子又は低分子は存在しない）：２）２０ｎｇ／ｍＬのＷｎｔ３ａ（Ｒ＆Ｄ　Ｓｙｓｔｅｍｓ；Ｃａｔ＃１３２４－ＷＮ／ＣＦ）と組み合わせた１００ｎｇ／ｍＬのアクチビンＡ（ＰｅｐｒｏＴｅｃｈ；Ｃａｔ　＃１２０－１４）；３）２０ｎｇ／ｍＬのＷｎｔ３ａ単独；４）任意の増殖因子又は低分子は不含で化合物３４（２．５μＭ）単独；５）任意の増殖因子又は低分子は不含で化合物５６（２．５μＭ）単独。試験サンプルの第２セットでは以下の条件を１００ｎｇ／ｍＬのＧＤＦ３と組み合わせて試験した：１）添加剤不含（すなわちＧＤＦ－３単独）；２）２０ｎｇ／ｍＬのＷｎｔ３ａ；３）化合物３４（２．５μＭ）と２０ｎｇ／ｍＬのＷｎｔ３ａ；４）化合物３４（２．５μＭ）；５）化合物５６（２．５μＭ）；及び６）化合物５６（２．５μＭ）と２０ｎｇ／ｍＬのＷｎｔ３ａ。試験サンプルの第３セットでは、６つの各条件を１００ｎｇ／ｍＬのＧＤＦ－５と組み合わせた。試験サンプルの第４セットでは、６つの各条件を１００ｎｇ／ｍＬのＧＤＦ－８と組み合わせた。試験サンプルの第５セットでは、６つの各条件を１００ｎｇ／ｍＬのＧＤＦ－１０と組み合わせた。試験サンプルの第６セットでは、６つの各条件を１００ｎｇ／ｍＬのＧＤＦ－１１と組み合わせた。試験サンプルの第７セットでは、６つの各条件を１００ｎｇ／ｍＬのＧＤＦ－１５と組み合わせた。２％　ＦＢＳを添加したＤＭＥＭ：Ｆ１２培地に、１００ｎｇ／ｍＬのアクチビンＡ又は１００ｎｇ／ｍＬのそれぞれのＧＤＦ増殖因子をＷｎｔ３ａ又は化合物３４若しくは化合物５６は不含で希釈して、アッセイの第３日目に全ての試験サンプル用の全てのウェルに含有させた。

【０３６６】

ハイコンテンツな解析：培養の最後に、アッセイプレートをＰＢＳ（Ｉｎｖｉｔｒｏｇｅｎ；Ｃａｔ　＃　１４１９０）で１回洗浄し、４％パラホルムアルデヒド（Ａｌｅｘｉｓ　Ｂｉｏｃｈｅｍｉｃａｌ；Ｃａｔ　＃　ＡＬＸ－３５０－０１１）で室温で２０分間にわたって固定し、次いでＰＢＳで３回洗浄し、０．５％　Ｔｒｉｔｏｎ　Ｘ－１００（Ｓｉｇｍａ；Ｃａｔ　＃　Ｔ８７６０－２）で室温で２０分間にわたって透過処理した。細胞を再度ＰＢＳで３回洗浄し、４％ニワトリ血清（Ｉｎｖｉｔｒｏｇｅｎ；Ｃａｔ　＃　１６１１００８２）のＰＢＳ溶液で、室温で３０分間にわたってブロッキング処理した。一次抗体（ヤギ抗ヒトＳＯＸ１７；Ｒ＆Ｄ　Ｓｙｓｔｅｍｓ；Ｃａｔ　＃　ＡＦ１９２４）を４％ニワトリ血清に１：１００で希釈し、室温で２時間各ウェルに加えた。ＰＢＳでの３回の洗浄のあと、Ａｌｅｘａ　Ｆｌｕｏｒ　４８８を結合させた二次抗体（ニワトリ抗ヤギＩｇＧ；Ｉｎｖｉｔｒｏｇｅｎ；Ｃａｔ　＃Ａ２１４６７）をＰＢＳに１：２００希釈したものを各ウェルに加えた。核を対比染色するために、５μｇ／ｍＬ　Ｈｏｅｃｈｓｔ　３３３４２（Ｉｎｖｉｔｒｏｇｅｎ；Ｃａｔ　＃　Ｈ３５７０）を室温で１５分間加えた。プレートをＰＢＳで１回洗浄し、撮像のために１００μＬ／ウェルのＰＢＳで残した。

【０３６７】

Ｈｏｅｃｈｓｔ　３３３４２とＡｌｅｘａ　Ｆｌｕｏｒ　４８８とで染色した細胞用に５１００８ｂｓダイクロイックを利用して、ＩＮ　Ｃｅｌｌ　Ａｎａｌｙｚｅｒ　１００

０（ＧＥ　Ｈｅａｌｔｈｃａｒｅ）を用いて撮像を実施した。１ウェルあたり２５視野から撮像を得た。ＩＮ　Ｃｅｌｌ　Ｄｅｖｅｌｏｐｅｒ　Ｔｏｏｌｂｏ　ｘ１．７（ＧＥ　Ｈｅａｌｔｈｃａｒｅ）ソフトウェアを用いて総強度についての測定値を各ウェルから得た。核の分裂は、グレースケールレベル（ベースライン範囲１００～３００）と核の大きさに基づいて判定した。各複製データセットについて平均及び標準偏差を算出した。総タンパク質発現は、細胞面積によって乗じた細胞の総蛍光値として定義される総強度又は積分強度として記録した。バックグラウンドは、２００～４５００の間のグレースケール範囲の許容基準に基づいて除去した。総強度データは、各ウェルについての総強度を陽性対照についての平均総強度で除することにより正規化した。

【０３６８】

図８は胚体内胚葉への４日間の分化後のヒト胚性幹細胞におけるＳＯＸ１７タンパク質発現についてのハイコンテンツな画像解析を示す。各場合において、得られた結果をアクチビンＡ及びＷｎｔ３ａでの陽性対照処理に対して正規化した。図８Ａにおいて、陽性対照処理のみがＳＯＸ１７の有意な発現を行い；Ｗｎｔ３ａ単独あるいは化合物３４若しくは化合物５６単独での処理ではＳＯＸ１７発現の誘導に失敗した。図８のパネルＢ～Ｇに、それぞれの処理でアクチビンＡの代わりに各ＧＤＦ増殖因子を使用した場合のＳＯＸ１７発現濃度を正規化して示す。ＧＤＦ－３（図８Ｂ）及びＧＤＦ－５（図８Ｃ）はＳＯＸ１７の弱い発現を誘導したが、これは本発明の化合物の１つが存在している試験サンプルでのみであった。ＧＤＦ１０（図８Ｄ）、ＧＤＦ１１（図８Ｅ）及びＧＤＦ１５（図８Ｇ）はＧＤＦ３又はＧＤＦ５処理で観察されたレベルを超える有意なレベルのＳＯＸ１７発現を誘導したが、アクチビンＡ及びＷｎｔ３ａ処理で観察されたレベルには劣った。概してＳＯＸ１７発現はＧＤＦ－１０、ＧＤＦ－１１、又はＧＤＦ－１５をＷｎｔ３ａと組み合わせた場合にはごくわずかであったが、本発明の化合物の一つと組み合わせた場合には改善され；特に化合物３４と組み合わせた場合に改善された。図８ＤはＧＤＦ－８を用いた処理群について得られた結果を示し、化合物３４若しくは化合物５６のいずれかと組み合わせたＧＤＦ－８は、アクチビンＡ／Ｗｎｔ３ａ陽性対照について見られた結果を上回る、ＳＯＸ１７の強い誘導を引き起こした。これらの実施例の一部では、ＧＤＦ増殖因子と組み合わせた化合物３４若しくは化合物５６の存在はまた、分化時の細胞数の増加ももたらした。

【０３６９】

これらの収集された結果は、化合物３４若しくは化合物５６と組み合わせて使用した場合、試験した全ての他のＧＤＦファミリーメンバーをＧＤＦ－８が上回ったことと、並びに胚体内胚葉分化時にＧＤＦ－８がアクチビンＡと代替し得ることを立証する。

【０３７０】

（実施例１４）

タンパク質のＴＧＦスーパーファミリーのその他のメンバーによる、胚体内胚葉系に特徴的なマーカーを発現している細胞の形成

ヒト胚性幹細胞をその他のＴＧＦスーパーファミリーメンバーで処理した場合、胚体内胚葉系に特徴的なマーカーを発現している細胞の形成を促進し得るかを判定することは重要であった。化合物３４及びＷｎｔ３ａをＴＧＦβ－１、ＢＭＰ２、ＢＭＰ３、又はＢＭＰ４のいずれかと組み合わせてヒト胚性幹細胞で試験して、ＴＧＦスーパーファミリーメンバーの、ヒト胚性幹細胞を胚体内胚葉系に特徴的なマーカーを発現している細胞へと分化させる能力について判定した。並行して、ＧＤＦ－８の２つの異なる市販供給源をＷｎｔ３ａと組み合わせて、ヒト胚性幹細胞を胚体内胚葉系に特徴的なマーカーを発現している細胞へと分化させる能力について試験した。アクチビンＡとＷｎｔ３ａを使用する陽性対照を、比較目的で維持した。

【０３７１】

アッセイのための細胞の調製：ヒト胚性幹細胞（Ｈ１ヒト胚性幹細胞株）の保存培養物は、ｇｒｏｗｔｈ　ｆａｃｔｏｒ－ｒｅｄｕｃｅｄ　ＭＡＴＲＩＧＥＬ（商標）（ＢＤ　Ｂｉｏｓｃｉｅｎｃｅｓ；Ｃａｔ　＃　３５６２３１）でコートしたディッシュ上のＭＥ

Ｆ馴化培地中で、未分化の多能性状態のまま、平均して各４日ごとに継代しながら維持した。継代は、細胞培養物を１ｍｇ／ｍＬディスパーゼ（Ｉｎｖｉｔｒｏｇｅｎ；Ｃａｔ　＃　１７１０５－０４１）溶液に３７℃で５～７分間曝露して、続いて単層をＭＥＦ馴化培地ですすぎ、穏やかにかき取り、細胞クラスターを回収することにより実施した。クラスターを低速度で遠心して細胞ペレットを回収し、残留ディスパーゼを除去した。細胞クラスターはルーチン的な維持培養については１：３比又は１：４比で、あるいは直接アッセイについては１：１比で継代した。全てのヒト胚性幹細胞株は５０未満の継代数で維持し、正常な核型について及びマイコプラズマの非存在について、ルーチン的に評価した。

【０３７２】

細胞クラスターは、８ｎｇ／ｍＬのｂＦＧＦを添加したＭＥＦ馴化培地に均一に再懸濁して、ｇｒｏｗｔｈ　ｆａｃｔｏｒ－ｒｅｄｕｃｅｄ　ＭＡＴＲＩＧＥＬ（商標）をコートした９６ウェルＰａｃｋａｒｄ　ＶＩＥＷＰＬＡＴＥＳ（ＰｅｒｋｉｎＥｌｍｅｒ；Ｃａｔ　＃　６００５１８２）上に０．１ｍＬ／ウェルの用量を播種した。使用した培養培地を各ウェルから吸引し、等量の新鮮な培地と交換することで毎日の培地供給を実施した。アッセイの間、プレートは３７℃、５％　CO_2で維持した。

【０３７３】

アッセイ：各ウェルから培養培地を吸引し、試験培地のアリコート（１００μＬ）を加えて戻すことでアッセイを開始した。１日目と２日目に各ウェルから培地を吸引し、新鮮な試験培地と交換することで培地供給しながら、３つ組複製で、全部で３日間のアッセイ期間にわたる試験条件を実施した。様々な増殖因子タンパク質を試験のために、以下のように得た：ＢＭＰ－２（Ｒ＆Ｄ　Ｓｙｓｔｅｍｓ；Ｃａｔ　＃　３５５－ＢＭ）；ＢＭＰ－３（Ｒ＆Ｄ　Ｓｙｓｔｅｍｓ；Ｃａｔ　＃　１１３－ＢＰ）；ＢＭＰ－４（Ｒ＆Ｄ　Ｓｙｓｔｅｍｓ；Ｃａｔ　＃　３１４－ＢＰ）；ＴＧＦβ－１（Ｒ＆Ｄ　Ｓｙｓｔｅｍｓ；Ｃａｔ　＃　２４０－Ｂ）；ＧＤＦ－８（ＰｅｐｒｏＴｅｃｈ；Ｃａｔ　＃　１２０－００）；ＧＤＦ－８（Ｓｈｅｎａｎｄｏａｈ；Ｃａｔ　＃１００－２２）；及びアクチビンＡ（ＰｅｐｒｏＴｅｃｈ；Ｃａｔ　＃１２０－１４）。アッセイの初日に各ウェルを８０μＬの増殖培地［２．５％ウシ血清アルブミンフラクションＶ、脂肪酸不含（ＦＡＦ　ＢＳＡ）（ＭＰ　Ｂｉｏｍｅｄｉｃａｌｓ，Ｉｎｃ；Ｃａｔ　＃　１５２４０１）、及び１０ｎｇ／ｍＬのｂＦＧＦを含有しているＲＰＭＩ－１６４０（Ｉｎｖｉｔｒｏｇｅｎ；Ｃａｔ　＃：２２４００）］で処理した。一部のウェルでは増殖培地に２５ｎｇ／ｍＬのＷｎｔ３ａ（Ｒ＆Ｄ　Ｓｙｓｔｅｍｓ；Ｃａｔ　＃　１３２４－ＷＮ／ＣＦ）を添加して２０ｎｇ／ｍＬの最終アッセイ濃度を得た。一部のウェルでは、増殖培地にアクチビンＡを添加して１００ｎｇ／ｍＬの最終アッセイ濃度を得た。一部のウェルでは、増殖培地に３．１２５μＭの化合物３４を添加して、２．５μＭの最終アッセイ濃度を得た。追加の増殖因子（５ｘ濃縮品、ＲＰＭＩ－１６４０に希釈）を用量漸増させて同様にそれぞれの試験ウェルに加え、全ての処理条件について１００μＬの最終アッセイ容量を得た。アッセイの二日目にＷｎｔ３ａ及び化合物３４をアッセイから除去した。全てのウェルには８０μＬ増殖培地［２．５％　ＦＡＦ　ＢＳＡ、及び１０ｎｇ／ｍＬのｂＦＧＦを含有しているＲＰＭＩ－１６４０］及び２０μＬのそれぞれの増殖因子希釈物（５ｘ濃縮物をＲＰＭＩ－１６４０で希釈）を含有させた。本アッセイの比較対照には：１）増殖因子の添加なし；２）Ｗｎｔ３ａ単独；及び３）アクチビンＡとＷｎｔ３ａが挙げられる。ＧＤＦ－８の各市販供給源をＷｎｔ３ａと組み合わせて試験した。Ｗｎｔ３ａと、化合物３４と、及び化合物３４と組み合わせたＷｎｔ３ａの両方とで、各ＢＭＰ増殖因子並びにＴＧＦβ－１を試験した。

【０３７４】

ハイコンテンツな解析：培養の最後に、アッセイプレートをＰＢＳ（Ｉｎｖｉｔｒｏｇｅｎ；Ｃａｔ　＃　１４１９０）で１回洗浄し、４％パラホルムアルデヒド（Ａｌｅｘｉｓ　Ｂｉｏｃｈｅｍｉｃａｌ；Ｃａｔ　＃　ＡＬＸ－３５０－０１１）で室温で２０分間にわたって固定し、次いでＰＢＳで３回洗浄し、０．５％　Ｔｒｉｔｏｎ　Ｘ－１００（Ｓｉｇｍａ；Ｃａｔ　＃　Ｔ８７６０－２）で室温で２０分間にわたって透過処理した。

細胞を再度ＰＢＳで３回洗浄し、４％ニワトリ血清（Ｉｎｖｉｔｒｏｇｅｎ；Ｃａｔ ＃ １６１１００８２）のＰＢＳ溶液で、室温で３０分間にわたってブロッキング処理した。一次抗体（ヤギ抗ヒトＳＯＸ１７；Ｒ＆Ｄ Ｓｙｓｔｅｍｓ；Ｃａｔ ＃ ＡＦ１９２４）を４％ニワトリ血清に１：１００で希釈し、室温で２時間各ウェルに加えた。ＰＢＳでの３回の洗浄のあと、Ａｌｅｘａ Ｆｌｕｏｒ ４８８を結合させせた二次抗体（ニワトリ抗ヤギＩｇＧ；Ｉｎｖｉｔｒｏｇｅｎ；Ｃａｔ ＃Ａ２１４６７）をＰＢＳに１：２００希釈したものを各ウェルに加えた。核を対比染色するために、５μｇ／ｍＬ Ｈｏｅｃｈｓｔ ３３３４２（Ｉｎｖｉｔｒｏｇｅｎ；Ｃａｔ ＃ Ｈ３５７０）を室温で１５分間加えた。プレートをＰＢＳで１回洗浄し、撮像のために１００μＬ／ウェルのＰＢＳで残した。

【０３７５】

Ｈｏｅｃｈｓｔ ３３３４２とＡｌｅｘａ Ｆｌｕｏｒ ４８８とで染色した細胞用に５１００８ｂｓダイクロイックを利用して、ＩＮ Ｃｅｌｌ Ａｎａｌｙｚｅｒ １０００（ＧＥ Ｈｅａｌｔｈｃａｒｅ）を用いて撮像を実施した。１ウェルあたり２５視野から撮像を得た。ＩＮ Ｃｅｌｌ Ｄｅｖｅｌｏｐｅｒ Ｔｏｏｌｂｏｘ １．７（ＧＥ Ｈｅａｌｔｈｃａｒｅ）ソフトウェアを用いて総強度についての測定値を各ウェルから得た。核の分裂は、グレースケールレベル（ベースライン範囲１００～３００）と核の大きさに基づいて判定した。各複製データセットについて平均及び標準偏差を算出した。総タンパク質発現は、細胞面積によって乗じた細胞の総蛍光値として定義される総強度又は積分強度として記録した。バックグラウンドは、２００～４５００の間のグレースケール範囲の許容基準に基づいて除去した。総強度データは、各ウェルについての総強度を陽性対照についての平均総強度で除することにより正規化した。

【０３７６】

図９は胚体内胚葉への３日間の分化後のヒト胚性幹細胞におけるＳＯＸ１７タンパク質発現についてのハイコンテンツな画像解析を示す。各場合において、得られた結果をアクチビンＡとＷｎｔ３ａについての陽性対照処理に対して正規化した。図９Ａにおいて得られた結果は、増殖培地単独での、又はＷｎｔ３ａ単独での処理はＳＯＸ１７発現の誘導に失敗し；アクチビンＡを添加した処理のみがＳＯＸ１７の強い発現をもたらしたことを示す。図９のパネルＢ及びＣでは、ＧＤＦ－８の市販供給源の各々について得られた結果を記し、２つの製造供給元間の効力の差を示している。アクチビンＡよりも効力は劣るが、Ｗｎｔ３ａと組み合わせてＧＤＦ－８で処理した細胞においてＳＯＸ１７発現は有意に誘導された。図９のパネルＤ、Ｅ、Ｆ及びＧでは、Ｗｎｔ３ａ、又は化合物３４、又はＷｎｔ３ａと化合物３４の両方を組み合わせて、ＢＭＰ２、ＢＭＰ３、ＢＭＰ４、及びＴＧＦβ－１を、各増殖因子について用量漸増的に組み込んで用いた、胚体内胚葉分化で得られた結果を示している。一部の処理はアッセイの終了時に細胞数に対する有意な効果を有したが（例えば、ＢＭＰ２及びＢＭＰ４）、任意のこれらの増殖因子と処理との組み合わせから得られたＳＯＸ１７発現の誘導は、Ｗｎｔ３ａ処理単独の場合と比較して弱いかあるいはごくわずかであった。

【０３７７】

（実施例１５）

本発明の化合物の選択での、胚体内胚葉系に特徴的なマーカーを発現している細胞の形成についての、投与量範囲の研究

胚体内胚葉系に特徴的なマーカーを発現している細胞の形成を媒介し得る化合物１８１、化合物１８０、化合物１９、化合物２０２、化合物４０、及び化合物３４の最適作用濃度を知ることは重要であった。連動して、胚体内胚葉アッセイにおいて、アクチビンＡ又はＧＤＦ－８と組み合わせた各化合物の用量設定について、対照比較を実施した。最終的に、各化合物用の曝露時間をアッセイで試験し、アクチビンＡ又はＧＤＦ－８と組み合わせて、アッセイの初日のみか、あるいは胚体内胚葉形成の全３日間を通して化合物を添加した。

【０３７８】

アッセイのための細胞の調製：ヒト胚性幹細胞（Ｈ１ヒト胚性幹細胞株）の保存培養物は、ｇｒｏｗｔｈ　ｆａｃｔｏｒ－ｒｅｄｕｃｅｄ　ＭＡＴＲＩＧＥＬ（商標）（ＢＤ　Ｂｉｏｓｃｉｅｎｃｅｓ；Ｃａｔ　＃　３５６２３１）でコートしたディッシュ上の、８ｎｇ／ｍＬのｂＦＧＦ（ＰｅｐｒｏＴｅｃｈ　Ｉｎｃ．；Ｃａｔ　＃　１００－１８Ｂ）を添加したＭＥＦ馴化培地中で、未分化の多能性状態のまま、平均して各４日ごとに継代しながら維持した。継代は、細胞培養物を１ｍｇ／ｍＬディスパーゼ（Ｉｎｖｉｔｒｏｇｅｎ；Ｃａｔ　＃　１７１０５－０４１）溶液に３７℃で５～７分間曝露して、続いて単層をＭＥＦ馴化培地ですすぎ、穏やかにかき取り、細胞クラスターを回収することにより実施した。クラスターを低速度で遠心して細胞ペレットを回収し、残留ディスパーゼを除去した。細胞クラスターはルーチン的な維持培養については１：３比又は１：４比で、あるいは直接アッセイについては１：１比で継代した。全てのヒト胚性幹細胞株は５０未満の継代数で維持し、正常な核型について及びマイコプラズマの非存在について、ルーチン的に評価した。

【０３７９】

細胞クラスターは、８ｎｇ／ｍＬのｂＦＧＦを添加したＭＥＦ馴化培地に均一に再懸濁して、０．１ｍＬ／ウェルの用量を、ｇｒｏｗｔｈ　ｆａｃｔｏｒ－ｒｅｄｕｃｅｄ　ＭＡＴＲＩＧＥＬ（商標）をコートした９６ウェルＰａｃｋａｒｄ　ＶＩＥＷＰＬＡＴＥＳ（ＰｅｒｋｉｎＥｌｍｅｒ；Ｃａｔ　＃　６００５１８２）上に播種した。使用した培養培地を各ウェルから吸引し、等量の新鮮な培地と交換することで毎日の供給を実施した。アッセイの持続時間の間、プレートは３７℃、５％　CO_2で維持した。

【０３８０】

アッセイ：各ウェルから培養培地を吸引し、試験培地のアリコート（１００μＬ）を加えて戻すことでアッセイを開始した。各ウェルから培地を吸引し、新鮮な試験培地と交換することで毎日供給しながら、４つ組複製で、全部で４日間のアッセイ期間にわたる試験条件を実施した。各ウェルを８０μＬ増殖培地［２．５％ウシ血清アルブミンフラクションＶ、脂肪酸不含（ＦＡＦ　ＢＳＡ）（ＭＰ　Ｂｉｏｍｅｄｉｃａｌｓ，Ｉｎｃ；Ｃａｔ　＃　１５２４０１）、１０ｎｇ／ｍＬのｂＦＧＦ、及び追加の増殖因子（１．２５ｘ濃縮品）を含有しているＲＰＭＩ－１６４０（Ｉｎｖｉｔｒｏｇｅｎ；Ｃａｔ　＃：２２４００）］及び２０μＬ試験化合物（５ｘ濃縮品をＲＰＭＩ－１６４０に希釈）で処理し、各ウェル中に最終アッセイ用量１００μＬを得た。本アッセイにおける試験化合物は、本発明の６種類の化合物：化合物１８１、化合物１８０、化合物１９、化合物２０２、化合物４０、及び化合物３４、並びに市販供給されているＧＳＫ３ｉインヒビターＢＩＯ（ＥＭＤ　Ｃｈｅｍｉｃａｌｓ，Ｉｎｃ．；Ｃａｔ　＃　３６１５５０）を含んだ。アッセイの初日に、様々な対象又は実験条件でウェルを処理した。記載されるような最終アッセイ濃度を有する対照条件は以下のとおりである：１）増殖培地単独；２）２０ｎｇ／ｍＬのＷｎｔ３ａ単独（Ｒ＆Ｄ　Ｓｙｓｔｅｍｓ；Ｃａｔ　＃　１３２４－ＷＮ／ＣＦ）；３）１００ｎｇ／ｍＬのアクチビンＡ（ＰｅｐｒｏＴｅｃｈ；Ｃａｔ　＃１２０－１４）；４）１００ｎｇ／ｍＬのアクチビンＡ及び２０ｎｇ／ｍＬのＷｎｔ３ａ；５）１００ｎｇ／ｍＬのＧＤＦ－８（Ｒ＆Ｄ　Ｓｙｓｔｅｍｓ，Ｃａｔ　＃　７８８－Ｇ８）；６）１００ｎｇ／ｍＬのＧＤＦ－８及び２０ｎｇ／ｍＬのＷｎｔ３ａ。試験化合物を連続２倍段階希釈することで最終アッセイの７８ｎＭ～１０μＭの濃度範囲を得た。実験用の試験サンプルは、１００ｎｇ／ｍＬのアクチビンＡ又は１００ｎｇ／ｍＬのＧＤＦ－８と、それぞれの化合物の連続希釈物を組み合わせたものであり、両方の処理剤のセットは共にＷｎｔ３ａは不含であった。アッセイの２日目及び３日目に、２０ｎｇ／ｍＬのＷｎｔ３ａ又は希釈済み試験化合物をアクチビンＡ又はＧＤＦ－８のいずれかと組み合わせて、一部のウェルを引き続き処理した。その他のウェルでは、アクチビンＡ又はＧＤＦ－８処理をアッセイの２日目及び３日目にも続けたが、Ｗｎｔ３ａ又は希釈済み試験化合物は除去した。

【０３８１】

ハイコンテンツな解析：培養の最後に、アッセイプレートをＰＢＳ（Ｉｎｖｉｔｒｏｇｅｎ；Ｃａｔ　＃　１４１９０）で１回洗浄し、４％パラホルムアルデヒド（Ａｌｅｘｉ

ｓ　Ｂｉｏｃｈｅｍｉｃａｌ；Ｃａｔ　＃　ＡＬＸ－３５０－０１１）で室温で２０分間にわたって固定し、次いでＰＢＳで３回洗浄し、０．５％　Ｔｒｉｔｏｎ　Ｘ－１００（Ｓｉｇｍａ；Ｃａｔ　＃　Ｔ８７６０－２）で室温で２０分間にわたって透過処理した。細胞を再度ＰＢＳで３回洗浄し、４％ニワトリ血清（Ｉｎｖｉｔｒｏｇｅｎ；Ｃａｔ　＃　１６１１００８２）のＰＢＳ溶液で、室温で３０分間にわたってブロッキング処理した。一次抗体（ヤギ抗ヒトＳＯＸ１７；Ｒ＆Ｄ　Ｓｙｓｔｅｍｓ；Ｃａｔ　＃　ＡＦ１９２４）を４％ニワトリ血清に１：１００で希釈し、室温で２時間各ウェルに加えた。ＰＢＳでの３回の洗浄のあと、Ａｌｅｘａ　Ｆｌｕｏｒ　４８８を結合させた二次抗体（ニワトリ抗ヤギＩｇＧ；Ｉｎｖｉｔｒｏｇｅｎ；Ｃａｔ　＃Ａ２１４６７）をＰＢＳに１：２００希釈したものを各ウェルに加えた。核を対比染色するために、５μｇ／ｍＬ　Ｈｏｅｃｈｓｔ　３３３４２（Ｉｎｖｉｔｒｏｇｅｎ；Ｃａｔ　＃　Ｈ３５７０）を室温で１５分間にわたって加えた。プレートをＰＢＳで１回洗浄し、撮像のために１００μＬ／ウェルのＰＢＳで残した。

【０３８２】

Ｈｏｅｃｈｓｔ　３３３４２とＡｌｅｘａ　Ｆｌｕｏｒ　４８８とで染色した細胞用に５１００８ｂｓダイクロイックを利用して、ＩＮ　Ｃｅｌｌ　Ａｎａｌｙｚｅｒ　１０００（ＧＥ　Ｈｅａｌｔｈｃａｒｅ）を用いて撮像を実施した。１ウェルあたり２５視野から撮像を得た。ＩＮ　Ｃｅｌｌ　Ｄｅｖｅｌｏｐｅｒ　Ｔｏｏｌｂｏｘ　１．７（ＧＥ　Ｈｅａｌｔｈｃａｒｅ）ソフトウェアを用いて総強度についての測定値を各ウェルから得た。核の分裂は、グレースケールレベル（ベースライン範囲１００～３００）と核の大きさに基づいて判定した。各複製データセットについて平均及び標準偏差を算出した。総タンパク質発現は、細胞面積によって乗じた細胞の総蛍光値として定義される総強度又は積分強度として記録した。バックグラウンドは、２００～４５００の間のグレースケール範囲の許容基準に基づいて除去した。総強度データは、各ウェルについての総強度を陽性対照についての平均総強度で除することにより正規化した。

【０３８３】

結果：ハイコンテンツな解析で得られた結果は、ＳＯＸ１７発現については図１０～１４に、及びアッセイの終了時に得られた細胞数については図１５～１９に示す。図１０では、アクチビンＡ又はＧＤＦ－８を単独で又はＷｎｔ３ａと組み合わせて使用した対照処理から得られたＳＯＸ１７発現についての結果を示す。アクチビンＡ処理は、ＧＤＦ－８処理で観察されたものよりも有意により高いＳＯＸ１７発現をもたらした。同様にして、図１５でも見られるように、Ｗｎｔ３ａはアッセイの間の１日間又は３日間のいずれで存在していたかには関係なく、アクチビンＡ処理では、アッセイの終了時にＧＤＦ－８処理で見られるよりもより大きな数の細胞が得られた。アッセイの開始一日目に存在していたのか、あるいはアッセイの持続時間を通して３日間にわたって存在していたのかには関わらず、アクチビンＡ処理時の化合物１８１、化合物１８０、化合物１９、化合物２０２、化合物４０、又は化合物３４のいずれの添加もＳＯＸ１７発現を増加させず（図１１～１２）、あるいは細胞数を増加させなかった（図１７～１８）。しかしながら、ＧＤＦ－８と組み合わせての化合物１８１、化合物１８０、化合物１９、化合物２０２、化合物４０、又は化合物３４のいずれかでの処理は、ＳＯＸ１７発現を有意に改善し（図１３～１４）、及びまたアッセイ終了時の細胞数を増加させた（図１８～１９）。化合物１８１、化合物１８０、化合物１９、化合物２０２、化合物４０、又は化合物３４のいずれかとＧＤＦ－８とを組み合わせて使用したとき、多くの場合、アクチビンＡ処理で観察される結果と同程度に、ＳＯＸ１７発現及び細胞数が改善された。ＧＤＦ－８と組み合わせた場合の改善された分化は明らかに用量漸増の効果であったが、最も高い濃度では毒性がしばしば観察された。ほとんどの場合、化合物及びＧＤＦ－８での処理由来の最も有益な働きは、アッセイの開始時に一日だけ化合物に曝露する場合に認められた。一部の場合では、アッセイ時間の間中化合物を存在させることは有害作用を有さず、あるいはほんのわずかに有益効果を有した。これらの集積的な結果から、ＧＤＦ８処理と組み合わせての各化合物についての最適作用濃度を判定した。得られた結果は化合物特異的なものであり、概して本

アッセイで試験されたように１～１０μＭの範囲であった。
【０３８４】
（実施例１６）
膵内分泌腺系に特徴的なマーカーを発現している細胞への更なる分化を可能にする本発明の方法によらずに作製された、胚体内胚葉系に特徴的なマーカーを発現している細胞
更なる低分子をＧＤＦ－８と組み合わせて胚体内胚葉分化について試験した。これらとしては、市販のＧＳＫ３インヒビター並びに本発明の化合物が挙げられる。様々な低分子と組み合わせてＧＤＦ－８で処理した細胞に段階的な分化プロトコルを適用した。膵臓内胚葉系又は膵内分泌腺系に代表的なバイオマーカーの遺伝子発現により、分化の有効性を判定した。アクチビンＡとＷｎｔ３ａで処理した細胞の並行対照サンプルを、段階的な分化プロセスによって比較目的で維持した。
【０３８５】
アッセイのための細胞の調製：ヒト胚性幹細胞（Ｈ１ヒト胚性幹細胞株）の保存培養物は、ｇｒｏｗｔｈ　ｆａｃｔｏｒ－ｒｅｄｕｃｅｄ　ＭＡＴＲＩＧＥＬ（商標）（ＢＤ　Ｂｉｏｓｃｉｅｎｃｅｓ；Ｃａｔ　＃　３５６２３１）でコートしたディッシュ上のＭＥＦ馴化培地中で、未分化の多能性状態のまま、平均して各４日ごとに継代しながら維持した。継代は、細胞培養物を１ｍｇ／ｍＬディスパーゼ（Ｉｎｖｉｔｒｏｇｅｎ，Ｃａｔ　＃：１７１０５－０４１）溶液に３７℃で５～７分間曝露して、続いて単層をＭＥＦ馴化培地ですすぎ、穏やかにかき取り、細胞クラスターを回収することにより実施した。クラスターを低速度で遠心して細胞ペレットを回収し、残留ディスパーゼを除去した。細胞クラスターはルーチン的な維持培養については１：３比又は１：４比で、あるいは直接アッセイについては１：１比で継代した。全てのヒト胚性幹細胞株は５０未満の継代数で維持し、正常な核型について及びマイコプラズマの非存在について、ルーチン的に評価した。
【０３８６】
細胞クラスターは、８ｎｇ／ｍＬのｂＦＧＦを添加したＭＥＦ馴化培地に均一に再懸濁して、ｇｒｏｗｔｈ　ｆａｃｔｏｒ－ｒｅｄｕｃｅｄ　ＭＡＴＲＩＧＥＬをコートした２４ウェルのブラックウォール培養プレート（Ａｒｃｔｉｃ　Ｗｈｉｔｅ；Ｃａｔ　＃　ＡＷＬＳ－３０３０１２）上に０．５ｍＬ／ウェルの用量を蒔いた。使用した培養培地を各ウェルから吸引し、等量の新鮮な培地と交換することで毎日の培地供給を実施した。アッセイの持続時間の間、プレートは３７℃、５％　CO_2で維持した。
【０３８７】
アッセイ：各ウェルから培養培地を吸引し、試験培地のアリコート（０．５ｍＬ）を加えて戻すことでアッセイを開始した。培地を各ウェルから吸引し、新鮮な試験培地と交換することにより毎日培地供給しながら、分化の第１工程のための試験条件を３日間の期間にわたって実施した。２％ウシ血清アルブミンフラクションＶ、脂肪酸不含（ＦＡＦ　ＢＳＡ）（Ｐｒｏｌｉａｎｔ　Ｉｎｃ．Ｃａｔ　＃：ＳＫＵ　６８７００）、及び２０ｎｇ／ｍＬのＷｎｔ３ａ（Ｒ＆Ｄ　Ｓｙｓｔｅｍｓ；Ｃａｔ　＃　１３２４－ＷＮ／ＣＦ）を添加したＲＰＭＩ－１６４０培地（Ｉｎｖｉｔｒｏｇｅｎ；Ｃａｔ　＃：２２４００）中に各増殖因子を希釈したそれぞれのアッセイウェルに、アッセイの初日に１００ｎｇ／ｍＬのアクチビンＡ（ＰｅｐｒｏＴｅｃｈ；Ｃａｔ　＃１２０－１４）又は１００ｎｇ／ｍＬＧＤＦ－８（Ｒ＆Ｄ　Ｓｙｓｔｅｍｓ，Ｃａｔ　＃　７８８－Ｇ８）を加えた。アッセイの二日目に、２％　ＦＡＦ　ＢＳＡを添加した、Ｗｎｔ３ａは不含のＲＰＭＩ－１６４０培地中に、１００ｎｇ／ｍＬのアクチビンＡ又は１００ｎｇ／ｍＬのＧＤＦ－８を希釈した。ＧＤＦ－８を使用した一部の試験サンプルでは、Ｗｎｔ３ａを低分子化合物に置き換えて、胚体内胚葉分化の１日目だけに加えた。これらの低分子としては、化合物１９（アッセイ中２．５μＭ）、化合物２０２（アッセイ中２．５μＭ）、化合物４０（アッセイ中２．５μＭ）、又は市販のＧＳＫ３インヒビターＢＩＯ（アッセイ中０．５μＭ）（ＥＭＤ　Ｃｈｅｍｉｃａｌｓ，Ｉｎｃ．；Ｃａｔ　＃　３６１５５０）が挙げられる。分化の第１工程の終了時に、細胞を一部のウェルからフローサイトメトリー解析のために回収し、胚体内胚葉形成のマーカーであるＣＸＣＲ４のレベルを評価した。更にウェルをＲ

Ｔ－ＰＣＲ解析のために回収し、分化についての他のマーカーを測定した。
【０３８８】
胚体内胚葉分化の第１工程の最後に、各処理群からの並行ウェルの複製セットに更なる段階的な分化を施した。第１分化工程の後で、全てのウェルが引き続き培養され、同様の処理による分化を受けたことを注記しておく必要がある。この連続的な分化のためのプロトコルを以下に記載する。
【０３８９】
分化プロトコルの工程２を二日間にわたって実施した。各ウェルから培地を吸引し、２％　ＦＡＦ　ＢＳＡ、５０ｎｇ／ｍＬのＦＧＦ７（ＰｅｐｒｏＴｅｃｈ；Ｃａｔ　＃　１００－１９）、及び２５０ｎＭシクロパミン－ＫＡＡＤ（Ｃａｌｂｉｏｃｈｅｍ；Ｃａｔ　＃　２３９８０４）を含有しているＤＭＥＭ：Ｆ１２培地（Ｉｎｖｉｔｒｏｇｅｎ；Ｃａｔ　＃　１１３３０－０３２）の新鮮なアリコート（０．５ｍＬ）と交換することで、細胞に毎日培地供給した。
【０３９０】
分化プロトコルの工程３を７日間にわたって実施した。各ウェルから培地を吸引し、０．１％　Ａｌｂｕｍａｘ（Ｉｎｖｉｔｒｏｇｅｎ；Ｃａｔ　＃：１１０２０－０２１）、０．５ｘインスリントランスフェリンセレニウム（ＩＴＳ－Ｘ；Ｉｎｖｉｔｒｏｇｅｎ；Ｃａｔ　＃　５１５０００５６）、５０ｎｇ／ｍＬのＦＧＦ７、１００ｎｇ／ｍＬのノギン（Ｒ＆Ｄ　Ｓｙｓｔｅｍｓ；Ｃａｔ　＃　３３４４－ＮＧ）、２５０ｎＭのＫＡＡＤ－シクロパミン、及び２μＭのオールトランスレチノイン酸（ＲＡ）（Ｓｉｇｍａ－Ａｌｄｒｉｃｈ；Ｃａｔ　＃　Ｒ２６２５）を添加したＤＭＥＭ－高グルコース（Ｉｎｖｉｔｒｏｇｅｎ；Ｃａｔ　＃　１０５６９）の新鮮なアリコート（０．５ｍＬ）と交換することで、細胞に毎日培地供給した。分化の第３工程の終了時に、ＲＴ－ＰＣＲによる解析のために一部のウェルから細胞を回収し、分化マーカーを測定した。他の培養ウェルに対しては、Ｐｄｘ１及びＣｄｘ２のタンパク質発現レベルについてのハイコンテンツな画像解析を実施した。
【０３９１】
分化プロトコルの工程４を三日間にわたって実施した。各ウェルから培地を吸引し、０．１％　Ａｌｂｕｍａｘ、０．５ｘインスリントランスフェリンセレニウム、１００ｎｇ／ｍＬのノギン、及び１μＭ　Ａｌｋ５インヒビター（Ａｘｘｏｒａ；Ｃａｔ　＃　ＡＬＸ－２７０－４４５）を添加したＤＭＥＭ－高グルコースの新鮮なアリコート（０．５ｍＬ）と交換することで、細胞に毎日培地供給した。分化の第４工程の終了時に、ＲＴ－ＰＣＲによる解析のために一部のウェルから細胞を回収し、分化マーカーを測定した。他の培養ウェルに対しては、Ｐｄｘ１のタンパク質発現レベルについて、ハイコンテンツな画像解析を実施した。
【０３９２】
０．１％　Ａｌｂｕｍａｘ、０．５ｘインスリントランスフェリンセレニウム、及び１μＭ　Ａｌｋ５インヒビターを添加したＤＭＥＭ－高グルコースで、７日間にわたって分化プロトコルの工程５を実施した。毎日各ウェル中の培地を吸引し、新鮮なアリコート（０．５ｍＬ）で交換した。分化の第５工程の終了時に、ＲＴ－ＰＣＲによる解析のために一部のウェルから細胞を回収し、分化マーカーを測定した。他の培養ウェルには、インスリン及びグルカゴンのタンパク質発現レベルについてのハイコンテンツな画像解析を実施した。
【０３９３】
ＦＡＣＳ解析：０．５％ヒトγ－グロブリン（Ｓｉｇｍａ；Ｃａｔ＃　Ｇ－４３８６）のＰＢＳ（Ｉｎｖｉｔｒｏｇｅｎ；Ｃａｔ　＃　１４０４０－１３３）溶液とＢＤ　ＦＡＣＳ染色バッファーＢＳＡ（ＢＤ；Ｃａｔ　＃５５４６５７）との１：５溶液で、ＦＡＣＳ解析用の細胞を４℃で１５分間にわたってブロッキングした。次いでＣＤ９　ＰＥ（ＢＤ；Ｃａｔ　＃　５５５３７２）、ＣＤ９９　ＰＥ（Ｃａｌｔａｇ；Ｃａｔ　＃　ＭＨＣＤ９９０４）及びＣＸＣＲ４　ＡＰＣ（Ｒ＆Ｄ　Ｓｙｓｔｅｍｓ；Ｃａｔ＃　ＦＡＢ１７

３Ａ）に対する抗体で、細胞を４℃で３０分間にわたって染色した。ＢＤ　ＦＡＣＳ染色バッファでの一連の洗浄の後、生死判別のため細胞を７－ＡＡＤ（ＢＤ；Ｃａｔ　＃　５５９９２５）で染色し、ＢＤ　ＦＡＣＳ解析を実施した。ＰＥ及びＡＰＣの両方に対するマウスＩｇＧ１Ｋアイソタイプ対照抗体を、陽性細胞パーセントを得るために使用した。

【０３９４】

ＲＴ－ＰＣＲ解析：ＲＮＡサンプルを、エタノールを含有している高塩濃度緩衝液の存在下で、シリカゲル膜（Ｒｎｅａｓｙ　Ｍｉｎｉ　Ｋｉｔ，Ｑｉａｇｅｎ，ＣＡ）に結合させた後、洗浄して混入物を除去することにより精製した。ＲＮＡをＴＵＲＢＯ　ＤＮＡ－フリーキット（Ａｍｂｉｏｎ，ＩＮＣ）を使用して更に精製し、次いで高品質ＲＮＡを水中に溶出した。収率及び純度は分光光度計でのＡ２６０及びＡ２８０の測定値により評価した。ＡＢＩ（ＡＢＩ，ＣＡ）のｈｉｇｈ　ｃａｐａｃｉｔｙ　ｃＤＮＡ　ａｒｃｈｉｖｅ　ｋｉｔを使用して、精製したＲＮＡからＣＤＮＡコピーを作成した。

【０３９５】

特に述べない限り、全試薬はＡｐｐｌｉｅｄ　Ｂｉｏｓｙｓｔｅｍｓから購入した。ＡＢＩ　ＰＲＩＳＭ（登録商標）７９００配列検出システムを使用して、リアルタイムＰＣＲ反応を行った。２０ｎｇの逆転写ＲＮＡと共に、ＴＡＱＭＡＮ（登録商標）ＵＮＩＶＥＲＳＡＬ　ＰＣＲ　ＭＡＳＴＥＲ　ＭＩＸ（登録商標）（ＡＢＩ，ＣＡ）を、２０μＬの全反応容量で使用した。各ｃＤＮＡサンプルは２つ組複製で実施して、ピペッティング誤差を補正した。プライマー及びＦＡＭ－標識ＴＡＱＭＡＮ（登録商標）プローブを２００ｎＭの濃度で使用した。各標的遺伝子に関する発現レベルを、以前にＡｐｐｌｉｅｄ　Ｂｉｏｓｙｓｔｅｍｓにより開発されたヒトグリセルアルデヒド－３－リン酸デヒドロゲナーゼ（ＧＡＰＤＨ）内在性対照を使用して正規化した。プライマーセット及びプローブセットは表１２に一覧にしてある。最初に５０℃で２分間、次いで９５℃で１０分間インキュベーションした後、サンプルを、９５℃で１５秒間の変性工程と、その後の６０℃で１分間のアニーリング／伸長工程の２段階に４０サイクルかけた。ＧＥＮＥＡＭＰ（登録商標）７０００配列検出システムソフトウエアを使用して、データ解析を行った。各プライマー／プローブセットについて、増幅の指数関数領域の中央において蛍光強度が特定の値に到達したサイクル数としてのＣｔ値を決定した。比較Ｃｔ法を使用して、相対的な遺伝子発現レベルを算出した。簡潔に述べると、各ｃＤＮＡサンプルに関して、対象とする遺伝子のＣｔ値から内在性対照のＣｔ値を減算して、デルタＣｔ値（ΔＣｔ）を得た。増幅は１００％効率であると仮定し、正規化した標的量を２－ΔＣｔとして算出した。最終的なデータを、標準物質サンプルに関して表した。

【０３９６】

ハイコンテンツな解析：培養の最後に、アッセイプレートをＰＢＳ（Ｉｎｖｉｔｒｏｇｅｎ；Ｃａｔ　＃　１４１９０）で１回洗浄し、４％パラホルムアルデヒド（Ａｌｅｘｉｓ　Ｂｉｏｃｈｅｍｉｃａｌ；Ｃａｔ　＃　ＡＬＸ－３５０－０１１）で室温で２０分間にわたって固定し、次いでＰＢＳで３回洗浄し、０．５％　Ｔｒｉｔｏｎ　Ｘ－１００（Ｓｉｇｍａ；Ｃａｔ　＃　Ｔ８７６０－２）で室温で２０分間にわたって透過処理した。細胞を再度ＰＢＳで３回洗浄し、４％ニワトリ血清（Ｉｎｖｉｔｒｏｇｅｎ；Ｃａｔ　＃　１６１１００８２）のＰＢＳ溶液で、室温で３０分間にわたってブロッキング処理した。一次抗体（ヤギ抗ヒトＳＯＸ１７；Ｒ＆Ｄ　Ｓｙｓｔｅｍｓ；Ｃａｔ　＃　ＡＦ１９２４）を４％ニワトリ血清に１：１００で希釈し、室温で２時間各ウェルに加えた。ＰＢＳでの３回の洗浄のあと、Ａｌｅｘａ　Ｆｌｕｏｒ　４８８を結合させた二次抗体（ニワトリ抗ヤギＩｇＧ；Ｉｎｖｉｔｒｏｇｅｎ；Ｃａｔ　＃　Ａ２１４６７）をＰＢＳに１：２００希釈したものを各ウェルに加えた。核を対比染色するために、５μｇ／ｍＬ　Ｈｏｅｃｈｓｔ　３３３４２（Ｉｎｖｉｔｒｏｇｅｎ；Ｃａｔ　＃　Ｈ３５７０）を室温で１５分間にわたって加えた。プレートをＰＢＳで１回洗浄し、撮像のために１００μＬ／ウェルのＰＢＳで残した。解析に使用したその他の一次抗体には、１：２００希釈ウサギ抗ヒトインスリン（Ｃｅｌｌ　Ｓｉｇｎａｌｉｎｇ；Ｃａｔ　＃　Ｃ２７Ｃ９）、及び１：１５００希釈マウス抗ヒトグルカゴン（Ｓｉｇｍａ－Ａｌｄｒｉｃｈ；Ｃａｔ　＃　Ｇ２６

５４）が含まれた。解析に使用した二次抗体には、１：１０００希釈Ａｌｅｘａ Ｆｌｕｏｒ ６４７ニワトリ抗ウサギＩｇＧ（Ｉｎｖｉｔｒｏｇｅｎ；Ｃａｔ ＃ Ａ２１４４３）、及び１：１０００希釈Ａｌｅｘａ Ｆｌｕｏｒ ４８８ニワトリ抗マウスＩｇＧ（Ｉｎｖｉｔｒｏｇｅｎ；Ｃａｔ ＃ Ａ２１２００）が含まれた。

【０３９７】

Ｈｏｅｃｈｓｔ ３３３４２とＡｌｅｘａ Ｆｌｕｏｒ ４８８とで染色した細胞用に５１００８ｂｓダイクロイックを利用して、ＩＮ Ｃｅｌｌ Ａｎａｌｙｚｅｒ １０００（ＧＥ Ｈｅａｌｔｈｃａｒｅ）を用いて撮像を実施した。１ウェルあたり２５視野から撮像を得た。ＩＮ Ｃｅｌｌ Ｄｅｖｅｌｏｐｅｒ Ｔｏｏｌｂｏｘ １．７（ＧＥ Ｈｅａｌｔｈｃａｒｅ）ソフトウェアを用いて総強度についての測定値を各ウェルから得た。核の分裂は、グレースケールレベル（ベースライン範囲１００～３００）と核の大きさに基づいて判定した。各複製データセットについて平均及び標準偏差を算出した。総タンパク質発現は、細胞面積によって乗じた細胞の総蛍光値として定義される総強度又は積分強度として記録した。バックグラウンドは、２００～４５００の間のグレースケール範囲の許容基準に基づいて除去した。総強度データは、各ウェルについての総強度を陽性対照についての平均総強度で除することにより正規化した。

【０３９８】

代表的な分化マーカーについてのＰＣＲの結果を、分化の各工程から回収した細胞について表１４に示す。ＧＤＦ－８及びＷｎｔ３ａで処理したか、あるいはＧＤＦ－８及び低分子で処理したサンプルは、内胚葉分化及び内分泌腺分化に関連付けられるマーカーについて、同様の発現レベルを示した。

【０３９９】

図２０のパネルＡは、分化の第１工程後の胚体内胚葉マーカー（ＣＸＣＲ４）についてのＦＡＣＳ解析を示す。ＧＤＦ－８及びＷｎｔ３ａでのヒト胚性幹細胞の処理は、アクチビンＡ及びＷｎｔ３ａでの処理と比較して、ＣＸＣＲ４陽性細胞に関して同様の百分率を生み出す。ＧＤＦ－８及び本発明の化合物（化合物１９、化合物２０２、化合物４０、又はＧＳＫ３インヒビターＩＸ ＢＩＯ）でのヒト胚性幹細胞の処理も同様に、ＣＸＣ４陽性細胞に関して同等であるかあるいはわずかに高い百分率を生み出す。図２０のパネルＢは胚体内胚葉への３日間の分化後のヒト胚性幹細胞における正規化ＳＯＸ１７タンパク質発現についてのハイコンテンツな画像解析を示す。一部の場合では、ＧＤＦ－８での処理は、分化の第１工程の終了時により少ない細胞数をもたらした。しかしながら、Ｗｎｔ３ａ又は低分子阻害剤と組み合わせてのＧＤＦ－８処理では、胚体内胚葉のマーカーであるＳＯＸ１７の発現が明らかに誘導されていた。一例としては、ＧＤＦ－８と化合物４０での処理は、アクチビンＡとＷｎｔ３ａでの処理と同等の、培養物中の細胞数及びＳＯＸ１７発現をもたらした。

【０４００】

図２０のパネルＣは、分化工程５を通して処理した培養物から回収された相対的な細胞数についてのハイコンテンツな画像解析を示す。工程１の終了時でより早く観察されたように、一部の処理はアクチビンＡ及びＷｎｔ３ａでの処理と比較して細胞回収率の低下を引き起こした。この細胞数の減少は、特にＧＤＦ－８とＧＳＫ３インヒビターＢＩＯとを用いた処理群で見られ、またＧＤＦ－８と化合物１９とを用いた処理群でも見られた。追加のＧＤＦ－８処理群は、アクチビンＡとＷｎｔ３ａでの処理と類似の細胞回収率を有した。図２０のパネルＤ～Ｆでは、インスリン及びグルカゴンの正規化タンパク質レベルを、各処理群についてそれらのそれぞれの比とともに示す。インスリン及びグルカゴンの同様のレベルが、アクチビンＡとＷｎｔ３ａでの処理に対してＧＤＦ－８処理のそれぞれで得られ得ることは、Ｗｎｔ３ａ又は低分子と組み合わせてのＧＤＦ－８が、胚体内胚葉分化並びに続く膵臓内胚葉及び内分泌腺分化時にアクチビンＡと代替し得るということを実証する。

【０４０１】

（実施例１７）

ＧＤＦ－８及び膵内分泌腺系に特徴的なマーカーを発現している細胞への更なる分化を可能にする本発明の化合物を用いて作製された、胚体内胚葉系に特徴的なマーカーを発現している細胞

ＧＤＦ－８及びアクチビンＡと組み合わせて更なる低分子を胚体内胚葉分化について試験した。これらとしては、市販のＧＳＫ３インヒビター並びに本発明の化合物が挙げられる。様々な低分子と組み合わせてＧＤＦ－８で処理した細胞に段階的な分化プロトコルを適用した。膵臓内胚葉系及び膵内分泌腺系の代表的なバイオマーカーの遺伝子発現により、分化の有効性を判定した。アクチビンＡ及びＷｎｔ３ａで処理した細胞の並行対照サンプルを、段階的な分化プロセスによって比較目的で維持した。

【０４０２】

アッセイのための細胞の調製：ヒト胚性幹細胞（Ｈ１ヒト胚性幹細胞株）の保存培養物は、ｇｒｏｗｔｈ　ｆａｃｔｏｒ－ｒｅｄｕｃｅｄ　ＭＡＴＲＩＧＥＬ（商標）（ＢＤ　Ｂｉｏｓｃｉｅｎｃｅｓ；Ｃａｔ　＃　３５６２３１）でコートしたディッシュ上の、８ｎｇ／ｍＬのｂＦＧＦ（ＰｅｐｒｏＴｅｃｈ　Ｉｎｃ．；Ｃａｔ　＃　１００－１８Ｂ）を添加したＭＥＦ馴化培地中で、未分化の多能性状態のまま、平均して各４日ごとに継代しながら維持した。継代は、細胞培養物を１ｍｇ／ｍＬディスパーゼ（Ｉｎｖｉｔｒｏｇｅｎ；Ｃａｔ　＃　１７１０５－０４１）溶液に３７℃で５～７分間曝露して、続いて単層をＭＥＦ馴化培地ですすぎ、穏やかにかき取り、細胞クラスターを回収することにより実施した。クラスターを低速度で遠心して細胞ペレットを回収し、残留ディスパーゼを除去した。細胞クラスターはルーチン的な維持培養については１：３比又は１：４比で、あるいは直接アッセイについては１：１比で継代した。全てのヒトＥＳ細胞株は５０未満の継代数で維持し、正常な核型について及びマイコプラズマの非存在について、ルーチン的に評価した。

【０４０３】

細胞クラスターは、８ｎｇ／ｍＬのｂＦＧＦを添加したＭＥＦ馴化培地に均一に再懸濁して、ｇｒｏｗｔｈ　ｆａｃｔｏｒ－ｒｅｄｕｃｅｄ　ＭＡＴＲＩＧＥＬ（商標）をコートした２４ウェルのブラックウォール培養プレート（Ａｒｃｔｉｃ　Ｗｈｉｔｅ；Ｃａｔ　＃　ＡＷＬＳ－３０３０１２）上に０．５ｍＬ／ウェルの用量を蒔いた。使用した培養培地を各ウェルから吸引し、等量の新鮮な培地と交換することで毎日の供給を実施した。アッセイの間、プレートは３７℃、５％　CO_2で維持した。

【０４０４】

アッセイ：各ウェルから培養培地を吸引し、試験培地のアリコート（０．５ｍＬ）を加えて戻すことでアッセイを開始した。培地を各ウェルから吸引し、新鮮な試験培地と交換することにより毎日培地供給しながら、分化の第１工程のための試験条件を３日間の期間にわたって実施した。２％ウシ血清アルブミンフラクションＶ、脂肪酸不含（ＦＡＦ　ＢＳＡ）（ＭＰ　Ｂｉｏｍｅｄｉｃａｌｓ，Ｉｎｃ；Ｃａｔ　＃　１５２４０１）を添加したＲＰＭＩ－１６４０培地（Ｉｎｖｉｔｒｏｇｅｎ；Ｃａｔ　＃：２２４００）中に各増殖因子を希釈したそれぞれのアッセイウェルに、アッセイの初日に１００ｎｇ／ｍＬのアクチビンＡ（ＰｅｐｒｏＴｅｃｈ；Ｃａｔ　＃１２０－１４）又は１００ｎｇ／ｍＬＧＤＦ－８（Ｒ＆Ｄ　Ｓｙｓｔｅｍｓ，Ｃａｔ　＃　７８８－Ｇ８）を加えた。一部のサンプルには、２０ｎｇ／ｍＬのＷｎｔ３ａ（Ｒ＆Ｄ　Ｓｙｓｔｅｍｓ；Ｃａｔ　＃　１３２４－ＷＮ／ＣＦ）も含有させた。アッセイの二日目に、２％　ＦＡＦ　ＢＳＡを添加したＲＰＭＩ－１６４０培地に１００ｎｇ／ｍＬのアクチビンＡ又は１００ｎｇ／ｍＬのＧＤＦ－８を希釈し、全てのサンプルからＷｎｔ３ａは除外した。ＧＤＦ－８を使用する一部の試験サンプルでは、Ｗｎｔ３ａを所与の濃度の低分子化合物と置き換え、胚体内胚葉分化の初日のみに加えた。これらの低分子としては：化合物１８１（アッセイ中１．２５μＭ）、化合物１８０（アッセイ中２．５μＭ）、化合物１９（アッセイ中１０μＭ）、化合物２０２（アッセイ中２．５μＭ）、化合物４０（アッセイ中５μＭ）、化合物３４（アッセイ中２．５μＭ）、化合物２０６（アッセイ中２．５μＭ）、及び市販のＧＳＫ３インヒビターＩＸ　ＢＩＯ（アッセイ中１０μＭ）（ＥＭＤ　Ｃｈｅｍｉｃａｌｓ，Ｉｎｃ

．；Ｃａｔ　＃　３６１５５０）が挙げられる。分化の第１工程の終了時に、胚体内胚葉形成のマーカーであるＣＸＣＲ４のレベルを評価することを目的とするフローサイトメトリー解析のために、一部のウェルから細胞を回収した。更にウェルをＲＴ－ＰＣＲ解析のために回収し、分化についての他のマーカーを測定した。

【０４０５】

胚体内胚葉分化の第１工程の最後に、各処理群からの並行ウェルの複製セットを追加の段階的な分化にかけた。第１分化工程の後で、全てのウェルが引き続き培養され、同様の処理による分化を受けたことを注記しておく必要がある。この連続的な分化のためのプロトコルを以下に記載する。

【０４０６】

分化プロトコルの工程２を二日間にわたって実施した。各ウェルから培地を吸引し、２％　ＦＡＦ　ＢＳＡ、５０ｎｇ／ｍＬのＦＧＦ７（ＰｅｐｒｏＴｅｃｈ；Ｃａｔ　＃　１００－１９）、及び２５０ｎＭシクロパミン－ＫＡＡＤ（Ｃａｌｂｉｏｃｈｅｍ；Ｃａｔ　＃　２３９８０４）を含有しているＤＭＥＭ：Ｆ１２培地（Ｉｎｖｉｔｒｏｇｅｎ；Ｃａｔ　＃　１１３３０－０３２）の新鮮なアリコート（０．５ｍＬ）と交換することで、細胞に毎日培地供給した。

【０４０７】

分化プロトコルの工程３を四日間にわたって実施した。各ウェルから培地を吸引し、０．１％　Ａｌｂｕｍａｘ（Ｉｎｖｉｔｒｏｇｅｎ；Ｃａｔ　＃：１１０２０－０２１）、０．５ｘインスリントランスフェリンセレニウム（ＩＴＳ－Ｘ；Ｉｎｖｉｔｒｏｇｅｎ；Ｃａｔ　＃　５１５０００５６）、５０ｎｇ／ｍＬのＦＧＦ７、１００ｎｇ／ｍＬのノギン（Ｒ＆Ｄ　Ｓｙｓｔｅｍｓ；Ｃａｔ　＃　３３４４－ＮＧ）、２５０ｎＭのＫＡＡＤ－シクロパミン、及び２μＭのオールトランスレチノイン酸（ＲＡ）（Ｓｉｇｍａ－Ａｌｄｒｉｃｈ；Ｃａｔ　＃　Ｒ２６２５）を添加したＤＭＥＭ－高グルコース（Ｉｎｖｉｔｒｏｇｅｎ；Ｃａｔ　＃　１０５６９）の新鮮なアリコート（０．５ｍＬ）と交換することで、細胞に毎日培地供給した。分化の第３工程の最後に、ＲＴ－ＰＣＲによる解析のために一部のウェルから細胞を回収し、分化マーカーを測定した。

【０４０８】

分化プロトコルの工程４を三日間にわたって実施した。各ウェルから培地を吸引し、０．１％　Ａｌｂｕｍａｘ、０．５ｘインスリントランスフェリンセレニウム、１００ｎｇ／ｍＬのノギン、及び１μＭ　Ａｌｋ５インヒビター（Ａｘｘｏｒａ；Ｃａｔ　＃　ＡＬＸ－２７０－４４５）を添加したＤＭＥＭ－高グルコースの新鮮なアリコート（０．５ｍＬ）と交換することで、細胞に毎日培地供給した。分化の第４工程の終了時に、ＲＴ－ＰＣＲによる解析のために一部のウェルから細胞を回収し、分化マーカーを測定した。

【０４０９】

０．１％　Ａｌｂｕｍａｘ、０．５ｘインスリントランスフェリンセレニウム、及び１μＭ　Ａｌｋ５インヒビターを添加したＤＭＥＭ－高グルコースで、７日間にわたって分化プロトコルの工程５を実施した。毎日各ウェル中の培地を吸引し、新鮮なアリコート（０．５ｍＬ）で交換した。分化の第５工程の終了時に、ＲＴ－ＰＣＲによる解析のために一部のウェルから細胞を回収し、分化マーカーを測定した。他の培養ウェルには、インスリン及びグルカゴンのタンパク質発現レベルについてのハイコンテンツな画像解析を実施した。

【０４１０】

ＦＡＣＳ解析：０．５％ヒトγ－グロブリン（Ｓｉｇｍａ；Ｃａｔ＃　Ｇ－４３８６）のＰＢＳ（Ｉｎｖｉｔｒｏｇｅｎ；Ｃａｔ　＃　１４０４０－１３３）溶液とＢＤ　ＦＡＣＳ染色バッファー－ＢＳＡ（ＢＤ；Ｃａｔ　＃５５４６５７）との１：５溶液で、ＦＡＣＳ解析用の細胞を４℃で１５分間にわたってブロッキングした。次いでＣＤ９　ＰＥ（ＢＤ；Ｃａｔ　＃　５５５３７２）、ＣＤ９９　ＰＥ（Ｃａｌｔａｇ；Ｃａｔ　＃　ＭＨＣＤ９９０４）及びＣＸＣＲ４　ＡＰＣ（Ｒ＆Ｄ　Ｓｙｓｔｅｍｓ；Ｃａｔ＃　ＦＡＢ１７３Ａ）に対する抗体で、細胞を４℃で３０分間にわたって染色した。ＢＤ　ＦＡＣＳ染色

バッファでの一連の洗浄の後、生死判別のため細胞を７－ＡＡＤ（ＢＤ；Ｃａｔ　＃　５５９９２５）で染色し、ＢＤ　ＦＡＣＳ解析を実施した。ＰＥ及びＡＰＣの両方に対するマウスＩｇＧ１Ｋアイソタイプ対照抗体を、陽性細胞パーセントを得るために使用した。

【０４１１】

ＲＴ－ＰＣＲ解析：ＲＮＡサンプルを、エタノールを含有している高塩濃度緩衝液の存在下で、シリカゲル膜（Ｒｎｅａｓｙ　Ｍｉｎｉ　Ｋｉｔ，Ｑｉａｇｅｎ，ＣＡ）に結合させせた後、洗浄して混入物を除去することにより精製した。ＲＮＡをＴＵＲＢＯ　ＤＮＡフリーキット（Ａｍｂｉｏｎ，ＩＮＣ）を使用して更に精製し、次いで高品質ＲＮＡを水中に溶出した。収率及び純度は分光光度計でのＡ２６０及びＡ２８０の測定値により評価した。ＡＢＩ（ＡＢＩ，ＣＡ）のｈｉｇｈ　ｃａｐａｃｉｔｙ　ｃＤＮＡ　ａｒｃｈｉｖｅ　ｋｉｔを使用して、精製したＲＮＡからＣＤＮＡコピーを作成した。

【０４１２】

特に記載のない限り、全試薬はＡｐｐｌｉｅｄ　Ｂｉｏｓｙｓｔｅｍｓから購入した。ＡＢＩ　ＰＲＩＳＭ（登録商標）７９００配列検出システムを使用して、リアルタイムＰＣＲ反応を行った。２０ｎｇの逆転写ＲＮＡと共に、ＴＡＱＭＡＮ（登録商標）ＵＮＩＶＥＲＳＡＬ　ＰＣＲ　ＭＡＳＴＥＲ　ＭＩＸ（登録商標）（ＡＢＩ，ＣＡ）を、２０μＬの全反応容量で使用した。各ｃＤＮＡサンプルは２つ組複製で実施して、ピペッティング誤差を補正した。プライマー及びＦＡＭ－標識ＴＡＱＭＡＮ（登録商標）プローブを２００ｎＭの濃度で使用した。各標的遺伝子に関する発現レベルを、以前にＡｐｐｌｉｅｄ　Ｂｉｏｓｙｓｔｅｍｓにより開発されたヒトグリセルアルデヒド－３－リン酸デヒドロゲナーゼ（ＧＡＰＤＨ）内在性対照を使用して正規化した。プライマーセット及びプローブセットは表１２に一覧にしてある。最初に５０℃で２分間、次いで９５℃で１０分間インキュベーションした後、サンプルを、９５℃で１５秒間の変性工程と、その後の６０℃で１分間のアニーリング／伸長工程の２段階に４０サイクルかけた。ＧＥＮＥＡＭＰ（登録商標）７０００配列検出システムソフトウエアを使用して、データ解析を行った。各プライマー／プローブセットについて、増幅の指数関数領域の中央において蛍光強度が特定の値に到達したサイクル数としてのＣｔ値を決定した。比較Ｃｔ法を使用して、相対的な遺伝子発現レベルを算出した。簡潔に述べると、各ｃＤＮＡサンプルに関して、対象とする遺伝子のＣｔ値から内在性対照のＣｔ値を減算して、デルタＣｔ値（ΔＣｔ）を得た。増幅は１００％効率であると仮定し、正規化した標的量を２－ΔＣｔとして算出した。最終的なデータを、標準物質サンプルに関して表した。

【０４１３】

ハイコンテンツな解析：培養の最後に、アッセイプレートをＰＢＳ（Ｉｎｖｉｔｒｏｇｅｎ；Ｃａｔ　＃　１４１９０）で１回洗浄し、４％パラホルムアルデヒド（Ａｌｅｘｉｓ　Ｂｉｏｃｈｅｍｉｃａｌ；Ｃａｔ　＃　ＡＬＸ－３５０－０１１）で室温で２０分間にわたって固定し、次いでＰＢＳで３回洗浄し、０．５％　Ｔｒｉｔｏｎ　Ｘ－１００（Ｓｉｇｍａ；Ｃａｔ　＃　Ｔ８７６０－２）で室温で２０分間にわたって透過処理した。細胞を再度ＰＢＳで３回洗浄し、４％ニワトリ血清（Ｉｎｖｉｔｒｏｇｅｎ；Ｃａｔ　＃　１６１１００８２）のＰＢＳ溶液で、室温で３０分間にわたってブロッキング処理した。一次抗体（ヤギ抗ヒトＳＯＸ１７；Ｒ＆Ｄ　Ｓｙｓｔｅｍｓ；Ｃａｔ　＃　ＡＦ１９２４）を４％ニワトリ血清に１：１００で希釈し、室温で２時間各ウェルに加えた。ＰＢＳでの３回の洗浄のあと、Ａｌｅｘａ　Ｆｌｕｏｒ　４８８を結合させた二次抗体（ニワトリ抗ヤギＩｇＧ；Ｉｎｖｉｔｒｏｇｅｎ；Ｃａｔ　＃　Ａ２１４６７）をＰＢＳに１：２００希釈したものを各ウェルに加えた。核を対比染色するために、５μｇ／ｍＬ　Ｈｏｅｃｈｓｔ　３３３４２（Ｉｎｖｉｔｒｏｇｅｎ；Ｃａｔ　＃　Ｈ３５７０）を室温で１５分間加えた。プレートをＰＢＳで１回洗浄し、撮像のために１００μＬ／ウェルのＰＢＳで残した。解析のために使用した他の一次抗体には、１：１００希釈マウス抗ヒトＣＤＸ２（Ｉｎｖｉｔｒｏｇｅｎ；Ｃａｔ　＃　３９７８００）、１：１００希釈ヤギ抗ヒトＰｄｘ１（Ｓａｎｔａ　Ｃｒｕｚ　Ｂｉｏｔｅｃｈｎｏｌｏｇｙ；Ｃａｔ＃ＳＣ－１４６６４）、１：２００希釈ウサギ抗ヒトインスリン（Ｃｅｌｌ　Ｓｉｇｎａｌｉｎｇ；Ｃａｔ

＃ Ｃ２７Ｃ９）、及び１：１５００希釈マウス抗ヒトグルカゴン（Ｓｉｇｍａ－Ａｌｄｒｉｃｈ；Ｃａｔ ＃ Ｇ２６５４）が含まれた。解析のために使用した二次抗体には、１：４００希釈Ａｌｅｘａ Ｆｌｕｏｒ ６４７ニワトリ抗マウスＩｇＧ（Ｉｎｖｉｔｒｏｇｅｎ；Ｃａｔ ＃ Ａ－２１４６３）、１：２００希釈Ａｌｅｘａ Ｆｌｕｏｒ ４８８ロバ抗ヤギＩｇＧ（Ｉｎｖｉｔｒｏｇｅｎ；Ｃａｔ ＃ Ａ１１０５５）、１：１０００希釈Ａｌｅｘａ Ｆｌｕｏｒ ６４７ニワトリ抗ウサギＩｇＧ（Ｉｎｖｉｔｒｏｇｅｎ；Ｃａｔ ＃ Ａ２１４４３）、及び１：１０００希釈Ａｌｅｘａ Ｆｌｕｏｒ ４８８ニワトリ抗マウスＩｇＧ（Ｉｎｖｉｔｒｏｇｅｎ；Ｃａｔ ＃ Ａ２１２００）が含まれた。

【０４１４】

Ｈｏｅｃｈｓｔ ３３３４２とＡｌｅｘａ Ｆｌｕｏｒ ４８８とで染色した細胞用に５１００８ｂｓダイクロイックを利用して、ＩＮ Ｃｅｌｌ Ａｎａｌｙｚｅｒ １０００（ＧＥ Ｈｅａｌｔｈｃａｒｅ）を用いて撮像を実施した。１ウェルあたり２５視野から撮像を得た。ＩＮ Ｃｅｌｌ Ｄｅｖｅｌｏｐｅｒ Ｔｏｏｌｂｏｘ １．７（ＧＥ Ｈｅａｌｔｈｃａｒｅ）ソフトウェアを用いて総強度についての測定値を各ウェルから得た。核の分裂は、グレースケールレベル（ベースライン範囲１００～３００）と核の大きさに基づいて判定した。各複製データセットについて平均及び標準偏差を算出した。総タンパク質発現は、細胞面積によって乗じた細胞の総蛍光値として定義される総強度又は積分強度として記録した。バックグラウンドは、２００～４５００の間のグレースケール範囲の許容基準に基づいて除去した。総強度データは、各ウェルについての総強度を陽性対照についての平均総強度で除することにより正規化した。

【０４１５】

結果：代表的な分化マーカーについての結果を、分化の各段階から回収した細胞について図２１及び表１５に示す。図２１Ａ及びＢに、胚体内胚葉分化の第１工程時の様々な処理についての、ＣＸＣＲ４に対するフローサイトメトリーの結果を示す。図２１Ａは、アクチビンＡと組み合わせた様々な化合物での処理による、ＣＸＣＲ４発現に対する効果を示す。図２１Ｂは、ＧＤＦ－８と組み合わせた様々な化合物での処理による、ＣＸＣＲ４に対する効果を示す。アクチビンＡと組み合わせた本発明の化合物は、ＣＸＣＲ４発現を増加させなかった。しかしながら、この実施例で試験した本発明の全ての化合物は、ＧＤＦ－８と組み合わせたときにＣＸＣＲ４発現を増加させた。

【０４１６】

図２１Ｃ及び２１Ｄでは、アクチビンＡと組み合わせて選択された本発明の化合物（図２１Ｃ）又はＧＤＦ－８と組み合わせて選択された本発明の化合物（図２１Ｄ）を用いてプロトコルの工程１の間に適用された処理についての、分化の工程１の終了時の様々な分化マーカーに対する正規化ＲＴ－ＰＣＲの値を示す。同様の正規化ＲＴ－ＰＣＲ値を、分化プロトコルの第３工程の終了時（図２１Ｅ及び２１Ｆ）、及び分化プロトコルの第４工程の終了時（図２１Ｇ及び２１Ｈ）、及び分化プロトコルの第５工程の終了時（図２１Ｉ及び２１Ｊ）で評価した。本発明の化合物とＧＤＦ－８を組み合わせての分化工程１時の処理は、ＧＤＦ－８処理単独と比較して、様々な内胚葉マーカー及び膵臓マーカーの発現を改善した（図２１Ｆ及び２１Ｈ及び２１Ｊ）。本発明の化合物とアクチビンＡを組み合わせての処理は、アクチビンＡ単独での処理あるいはアクチビンＡとＷｎｔ３ａとでの処理と比較して、マーカーの発現をごくわずかに改善させたか、あるいは全く改善させなかった（図２１Ｅ、及び２１Ｇ及び２１Ｉ）。表１５は、各分化工程の終了時での追加の遺伝子マーカーについての比較ＣＴ値を要約し、アクチビンＡ又はＧＤＦ－８と本発明の化合物を組み合わせる、又は本発明の化合物を組み合わせないものである、工程１時の処理を比較する。分化の工程５の終了時に、ハイコンテンツな解析を実施して、細胞数（図２１Ｋ及び２１Ｍ）を測定し、並びにインスリン及びグルカゴン（図２１Ｌ及び２１Ｎ）のタンパク質発現を測定した。分化の第１工程時の、ＧＤＦ－８単独での、あるいはＧＤＦ－８と本発明の化合物を組み合わせての処理は、分化の第５工程の終了時にインスリン及びグルカゴンの発現をもたらし、ＧＤＦ－８が、胚体内胚葉形成の開始時にアクチビンＡ

に代わって機能し、及び続いて膵臓ホルモン産生細胞を誘導できるということを例証した。総じて、これらのデータは、任意のそれぞれの低分子の添加は、アクチビンＡと組み合わせての処理については、分化マーカーに対してごくわずかに影響したことを示す。しかしながら、ＧＤＦ８処理と組み合わせての低分子の添加は、分化工程１の終了時の胚体内胚葉分化に対しての即効性が有意に改善され、同様に工程３、４及び５の終了時の下流の分化マーカーに対しての即効性も有意に改善された。低分子のパネル内でばらつきも観察されたが、これはおそらくアッセイに使用した化合物の濃度及び／又は作用機序に起因するものである。

【０４１７】

（実施例１８）

ＧＤＦ－８と本発明の化合物を使用して形成した、胚体内胚葉系に特徴的なマーカーを発現している細胞は、げっ歯類に移植した後にＣ－ペプチドを放出できる

ＧＤＦ－８と低分子での処理によりインビトロで作製された膵臓内胚葉系に特徴的なマーカーを発現している細胞が、インビボで機能的な内分泌細胞を生成し得るか否かを判定することは重要であった。インビボ移植実験を実施して、アクチビンＡとＷｎｔ３ａでの処理により分化させた細胞と、ＧＤＦ－８と低分子化合物での処理により分化させた細胞とを比較した。

【０４１８】

細胞の調製：Ｈ１ヒト胚性幹細胞のクラスターを、平均して４日ごとに継代しながら、ｇｒｏｗｔｈ　ｆａｃｔｏｒ－ｒｅｄｕｃｅｄ　ＭＡＴＲＩＧＥＬ（商標）（Ｉｎｖｉｔｒｏｇｅｎ；Ｃａｔ　＃　３５６２３１）をコートした組織培養プラスチック上で増殖させた。８ｎｇ／ｍＬのｂＦＧＦを添加したＭＥＦ馴化培地を最初の播種及び増殖に使用した。全てのヒトＥＳ細胞株は５０未満の継代数で維持し、正常な核型について及びマイコプラズマ汚染の非存在について、ルーチン的に評価した。

【０４１９】

細胞継代は、細胞培養物を１ｍｇ／ｍＬディスパーゼ（Ｉｎｖｉｔｒｏｇｅｎ，Ｃａｔ　＃１７１０５－０４１）溶液に３７℃で５～７分間曝露して、続いて細胞単層をＭＥＦ馴化培地ですすぎ、穏やかにかき取り、細胞クラスターを回収することにより実施した。細胞クラスターをＭＥＦ馴化培地中で低速で遠心して残留ディスパーゼを取り除き、８ｎｇ／ｍＬのｂＦＧＦ（ＰｅｐｒｏＴｅｃｈ　Ｉｎｃ．；Ｃａｔ　＃　１００－１８Ｂ）を添加したＭＥＦ馴化培地に均一に再懸濁し、ｇｒｏｗｔｈ　ｆａｃｔｏｒ－ｒｅｄｕｃｅｄ　ＭＡＴＲＩＧＥＬ（ＢＤ　Ｂｉｏｓｃｉｅｎｃｅｓ；Ｃａｔ　＃　３５６２３１）をコートした６ウェルプレート（Ｎｕｎｃ；Ｃａｔ＃　１４０６８５）上に２．５ｍＬ／ウェルの用量を用いて１：３比で播種した。使用した培養培地を各ウェルから吸引し、等量の新鮮な培地と交換することで毎日の培地供給を実施した。培養時間を通して、プレートは３７℃、５％　CO_2で維持した。

【０４２０】

細胞分化：ｇｒｏｗｔｈ　ｆａｃｔｏｒ－ｒｅｄｕｃｅｄ　ＭＡＴＲＩＧＥＬ（商標）をコートした６ウェルプレート上に細胞を播種した３日後に分化プロセスを開始した。膵臓内胚葉系に特徴的なマーカーを発現している細胞へのＨ１ヒト胚性幹細胞のインビトロ分化のために、４工程のプロトコルを使用した。工程１を３日間にわたって実施して、胚体内胚葉細胞を生成した。工程１の初日に、使用済み培養培地を吸引し、２％ウシ血清アルブミンフラクションＶ、脂肪酸不含（ＦＡＦ　ＢＳＡ）（Ｐｒｏｌｉａｎｔ　Ｂｉｏｌｏｇｉｃａｌｓ；Ｃａｔ　＃　ＳＫＵ　６８７００）及び８ｎｇ／ｍＬのｂＦＧＦを添加した等量のＲＰＭＩ－１６４０基本培地（Ｉｎｖｉｔｒｏｇｅｎ；Ｃａｔ　＃　２２４００）を加えることで分化を開始させた。第１処理群では、細胞を１００ｎｇ／ｍＬのアクチビンＡ（ＰｅｐｒｏＴｅｃｈ；Ｃａｔ　＃１２０－１４）と２０ｎｇ／ｍＬのＷｎｔ３ａ（Ｒ＆Ｄ　Ｓｙｓｔｅｍｓ；Ｃａｔ　＃　１３２４－ＷＮ／ＣＦ）に曝露した。第２処理群では、細胞を１００ｎｇ／ｍＬのＧＤＦ－８（Ｒ＆Ｄ　Ｓｙｓｔｅｍｓ；Ｃａｔ　＃　７８８－Ｇ８）と２．５μＭ化合物４０に曝露した。第３処理群では、細胞を１００ｎ

ｇ／ｍＬのＧＤＦ－８（Ｒ＆Ｄ Ｓｙｓｔｅｍｓ；Ｃａｔ ＃ ７８８－Ｇ８）と２．５μＭ化合物２０２に曝露した。分化の工程１の２日目及び３日目に、全ての処理群の細胞に、２％ ＦＡＦ ＢＳＡ、８ｎｇ／ｍＬのｂＦＧＦ、及び１００ｎｇ／ｍＬのアクチビンＡ（処理群１）か若しくは１００ｎｇ／ｍＬのＧＤＦ－８（処理群２及び３）のどちらかを含有させ、Ｗｎｔ３ａ又は本発明の化合物は追加しないＲＰＭＩ－１６４０を供給した。培養３日目の終了時に、ＦＡＣＳ解析のために各処理群から１ウェル回収した。

【０４２１】

分化プロトコルの工程２を三日間にわたって実施した。全ての処理群の細胞に、２％ ＦＡＦ ＢＳＡ及び５０ｎｇ／ｍＬ ＦＧＦ７（ＰｅｐｒｏＴｅｃｈ；Ｃａｔ ＃ １００－１９）を添加したＤＭＥＭ：Ｆ１２（Ｉｎｖｉｔｒｏｇｅｎ；Ｃａｔ ＃ １１３３０－０３２）を毎日供給した。

【０４２２】

分化プロトコルの工程３を四日間にわたって実施した。全ての処理群の細胞に、１％ Ｂ２７（Ｉｎｖｉｔｒｏｇｅｎ；Ｃａｔ ＃：１７５０４－０４４）、５０ｎｇ／ｍＬのＦＧＦ７、１００ｎｇ／ｍＬのノギン（Ｒ＆Ｄ Ｓｙｓｔｅｍｓ；Ｃａｔ ＃ ３３４４－ＮＧ）、２５０ｎＭのＫＡＡＤ－シクロパミン（Ｃａｌｂｉｏｃｈｅｍ；Ｃａｔ ＃ ２３９８０４）、及び２μＭのオールトランスレチノイン酸（ＲＡ）（Ｓｉｇｍａ－Ａｌｄｒｉｃｈ；Ｃａｔ ＃ Ｒ２６２５）を添加したＤＭＥＭ－高グルコース（Ｉｎｖｉｔｒｏｇｅｎ；Ｃａｔ ＃ １０５６９）を毎日供給した。

【０４２３】

分化プロトコルの工程４を三日間にわたって実施した。全ての処理群の細胞には、１％のＢ２７、１００ｎｇ／ｍＬのノギン、及び１μＭのＡＬＫ５インヒビター（Ａｘｘｏｒａ；Ｃａｔ ＃ ＡＬＸ－２７０－４４５）を添加したＤＭＥＭ－高グルコースを、最初の２日間毎日供給した。３日目に、細胞を２０μＬチップ（Ｒａｉｎｉｎ；Ｃａｔ ＃ ＲＴ－Ｌ１０Ｆ）及びセルスクレーパー（Ｃｏｒｎｉｎｇ；Ｃａｔ ＃ ３００８）を用いて基層から拾い上げ、５０ｍＬチューブへと移した。重力により細胞を沈降させ、細胞ペレットを乱さずに上清を吸引した。細胞を１％のＢ２７、１００ｎｇ／ｍＬのノギン、及び１μＭのＡＬＫ５インヒビターを添加したＤＭＥＭ－高グルコースに再懸濁し、次いで６ウェルＣｏｓｔａｒ Ｕｌｔｒａ Ｌｏｗ Ａｔｔａｃｈｍｅｎｔ Ｍｉｃｒｏｐｌａｔｅｓ（Ｃｏｒｎｉｎｇ Ｉｎｃ．，Ｃａｔ ＃ ３４７１）で一晩培養した。翌日、培養懸濁液中の細胞を回収して計数した。移植には、１０×１０^{6}個細胞／マウスのアリコートを使用した。ＲＴ－ＰＣＲ解析用には、細胞０．５×１０^{6}個のアリコートを回収した。

【０４２４】

図２２のパネルＡは、各処理群のそれぞれの工程１の終了時に生成した胚体内胚葉細胞についての、フローサイトメトリーの結果を示す。アクチビンＡとＷｎｔ３ａでの処理又はＧＤＦ－８と本発明の化合物での処理は、工程１の終了時に同様のレベルのＣＸＣＲ４（８５％を超える）を発現している細胞をもたらし、細胞の同等の胚体内胚葉集団が各処理群から生成されたことを示唆した。

【０４２５】

分化プロトコルの工程４の終了時の各処理群由来の細胞についてのＲＴ－ＰＣＲ解析の結果を、図２２のパネルＢに示す。アクチビンＡとＷｎｔ３ａ、又はＧＤＦ－８と化合物４０、又はＧＤＦ－８と化合物２０２を用いることにより膵臓内胚葉（ＰＥ）へと分化させた細胞は、同レベルでＰＥマーカー（ＣＤＸ２、ＭＡＦＡ、ＮＧＮ３、ＮＫＸ６．１、ＰＤＸ１及びＰｔｆ１α）を発現していた。これらの結果は、ＧＤＦ－８と低分子を利用する分化プロトコルは、細胞の膵臓内胚葉前駆体集団を作製するのに同様に効果的であったことを示唆する。

【０４２６】

本発明の方法により処理されたヒト胚性幹細胞のマウスへの移植：５～６週齢のオスのｓｃｉｄ－ｂｅｉｇｅマウス（Ｃ．Ｂ－Ｉｇｈ－１ｂ／ＧｂｍｓＴａｃ－Ｐｒｋｄｃ^{scid}

－Ｌｙｓｔ^{bg}Ｎ７）をＴａｃｏｎｉｃ　Ｆａｒｍｓより購入した。滅菌した餌と水を自由に利用できるような状態で、マウスをｍｉｃｒｏｉｓｏｌａｔｏｒケージ内に収容した。外科手術の準備に、マウスをイヤータグで同定し、体重を測定し、手持ち式ｇｌｕｃｏｍｅｔｅｒ（ＬｉｆｅＳｃａｎ；Ｏｎｅ　Ｔｏｕｃｈ）を用いて血糖を測定した。外科手術の日に、マウスにイソフルランと酸素の混合物で麻酔をかけ、手術部位を小動物用はさみで剪毛した。マウスには手術前に皮下に０．１ｍｇ．ｋｇ　Ｂｕｐｒｅｎｅｘを投与した。７０％イソプロピルアルコール、１０％ポビドンヨード、及び７０％イソプロピルアルコールで連続的に洗浄して手術部位の用意をし、皮膚層と筋層を貫通させて左側方切開部を作製した。左腎を露出させ、０．９％塩化ナトリウムで保湿させた。２４Ｇ×３／４”Ｉ．Ｖ．カテーテルを使用して腎臓被膜を貫通させた後、針を除去した。次いで腎臓被膜下でカテーテルを腎臓の遠位極（distal pole）まで前進させた。マウスの手術前準備の間に、移植用の細胞を１．５ｍＬ遠心管で遠心し、次いで細胞のペレットを回収するのに十分な量の培地を残しながらほとんどの上清を除去した。細胞をＲａｉｎｉｎ製Ｐｏｓ－Ｄポジティブディスプレイスメント式ピペットチップに回収し、ピペットを反転させて重力により細胞を沈降させた。移植用に充填した細胞調製物を残して過剰な培地を出した。移植のためにＰｏｓ－Ｄピペットチップをカテーテルのハブにしっかりと取り付け、腎臓の遠位極へと供給するために腎臓被膜下でカテーテルを通してピペットから細胞を分配した。カテーテルの内腔に少量の培養培地を流し、残留している任意の細胞を放出させ、カテーテルを引き抜いた。腎臓被膜を低温焼灼でシールし、腎臓を元の解剖学的な位置に戻した。５－０　ＶＩＣＲＹＬ縫合糸を用いて連続縫合により筋を閉じ、皮膚を創傷クリップにより閉じた。マウスから麻酔を取り除き、完全に回復させた。マウスには手術後に１．０ｍｇ．ｋｇ　Ｍｅｔａｃａｍを皮下投与した。

【０４２７】

移植の後で、マウスを週に１回秤量し、週に２回血糖を測定した。移植に続き、マウスには様々な間隔で３ｇ／ｋｇグルコースを腹腔内投与し、グルコース注入の６０分後に、ヘパリンを少量含有している遠心管へと後眼窩静脈洞から血液を吸引した。血液を遠心分離し、２本目の遠心管中に血漿を配置し、ドライアイス上で凍らせ、ヒトＣ－ペプチドアッセイを実施するまでの間－８０℃で保管した。ヒトＣ－ペプチドレベルは製造者による取扱説明書に従って、Ｍｅｒｃｏｄｉａ／ＡＬＰＣＯ社の診断用超高感度ＣペプチドＥＬＩＳＡを用いて測定した。

【０４２８】

各処理群のそれぞれからの細胞を移植したマウスに対する、ヒトＣ－ペプチドについてのＥＬＩＳＡの結果を図２３に示す。任意の処理群からの細胞を移植した任意のマウスでは、移植後４週間では循環しているヒトＣ－ペプチドは観察されなかった。移植後８週間では、検出可能なＣ－ペプチドが、アクチビンＡとＷｎｔ３ａで処理した細胞を移植した２匹のマウスのうちの１匹で；ＧＤＦ－８と化合物４０で処理した細胞を移植した３匹のマウスのうちの１匹で；ＧＤＦ－８と化合物２０２で処理した細胞を移植した３匹のマウスのうちの２匹で見出された。これらの結果は、同等の内分泌腺前駆体細胞の集団がＧＤＦ－８と低分子での分化プロトコル由来のものであり得ること、並びに、細胞は更に、インビボでグルコース応答性の、インスリン分泌細胞へと成熟したことを示唆する。

【０４２９】

（実施例１９）

ＧＤＦ－８を用いて作製された、胚体内胚葉系に特徴的なマーカーを発現している細胞は、げっ歯類への移植後にＣ－ペプチドを放出する能力を有する

アクチビンＡの非存在下でＧＤＦ－８で分化させた細胞が同様に、インビボげっ歯類移植モデルにおいて、ヒトＣ－ペプチドを分泌する能力を有する内分泌細胞集団へと更に分化し得ることを例証することは重要であった。

【０４３０】

細胞の調製：Ｈ１ヒト胚性幹細胞のクラスターを、平均して４日ごとに継代しながら、ｇｒｏｗｔｈ　ｆａｃｔｏｒ－ｒｅｄｕｃｅｄ　ＭＡＴＲＩＧＥＬ（商標）（Ｉｎｖｉｔ

ｒｏｇｅｎ；Ｃａｔ　＃　３５６２３１）をコートした組織培養プラスチック上で増殖させた。８ｎｇ／ｍＬのｂＦＧＦを添加したＭＥＦ馴化培地を最初の播種及び増殖に使用した。全てのヒトＥＳ細胞株は５０未満の継代数で維持し、正常な核型について及びマイコプラズマ汚染の非存在について、ルーチン的に評価した。

【０４３１】

細胞継代は、細胞培養物を１ｍｇ／ｍＬディスパーゼ（Ｉｎｖｉｔｒｏｇｅｎ，Ｃａｔ　＃　１７１０５－０４１）溶液に３７℃で５～７分間曝露して、続いて細胞単層をＭＥＦ馴化培地ですすぎ、穏やかにかき取り、細胞クラスターを回収することにより実施した。細胞クラスターをＭＥＦ馴化培地中で低速で遠心して残留ディスパーゼを取り除き、８ｎｇ／ｍＬのｂＦＧＦ（ＰｅｐｒｏＴｅｃｈ　Ｉｎｃ．；Ｃａｔ　＃　１００－１８Ｂ）を添加したＭＥＦ馴化培地に均一に再懸濁し、ｇｒｏｗｔｈ　ｆａｃｔｏｒ－ｒｅｄｕｃｅｄ　ＭＡＴＲＩＧＥＬ（商標）（ＢＤ　Ｂｉｏｓｃｉｅｎｃｅｓ；Ｃａｔ　＃　３５６２３１）をコートした６ウェルプレート（Ｎｕｎｃ；Ｃａｔ＃　１４０６８５）上に２．５ｍＬ／ウェルの用量を用いて１：３比で播種した。使用した培養培地を各ウェルから吸引し、等量の新鮮な培地と交換することで毎日の培地供給を実施した。培養の間、プレートは３７℃、５％　CO_2で維持した。

【０４３２】

細胞分化：細胞を６ウェルプレートに播種して３日後に分化プロセスを開始させた。膵臓内胚葉系に特徴的なマーカーを発現している細胞へのＨ１ヒト胚性幹細胞のインビボ分化のために、４工程のプロトコルを使用した。工程１を３日間にわたって実施し、胚体内胚葉系に特徴的なマーカーを発現している細胞を生成させた。工程１の初日に、使用済み培養培地を吸引し、２％ウシ血清アルブミンフラクションＶ、脂肪酸不含（ＦＡＦ　ＢＳＡ）（Ｐｒｏｌｉａｎｔ　Ｂｉｏｌｏｇｉｃａｌｓ；Ｃａｔ　＃　ＳＫＵ　６８７００）及び８ｎｇ／ｍＬのｂＦＧＦを添加した等量のＲＰＭＩ－１６４０基本培地（Ｉｎｖｉｔｒｏｇｅｎ；Ｃａｔ　＃　２２４００）を加えることで分化を開始させた。第１処理群では、細胞の２つ組複製セットを１００ｎｇ／ｍＬのＧＤＦ－８（Ｒ＆Ｄ　Ｓｙｓｔｅｍｓ；Ｃａｔ　＃　７８８－Ｇ８）と２０ｎｇ／ｍＬのＷｎｔ３ａ（Ｒ＆Ｄ　Ｓｙｓｔｅｍｓ；Ｃａｔ　＃　１３２４－ＷＮ／ＣＦ）で処理した。第２処理群では、細胞の２つ組複製セットを１００ｎｇ／ｍＬのＧＤＦ－８と２．５μＭの化合物４０で処理した。分化工程１の２日目と３日目で、全ての処理群の細胞に、２％　ＦＡＦ　ＢＳＡ、８ｎｇ／ｍＬのｂＦＧＦ及び１００ｎｇ／ｍＬのＧＤＦ－８を含有しているがＷｎｔ３ａあるいは化合物４０は不含のＲＰＭＩ－１６４０を供給した。培養３日目の終了時に、ＦＡＣＳ解析のために各処理群から１ウェル回収した。

【０４３３】

分化プロトコルの工程２を３日間にわたって実施した。全ての処理群の細胞に、２％　ＦＡＦ　ＢＳＡ及び５０ｎｇ／ｍＬのＦＧＦ７（ＰｅｐｒｏＴｅｃｈ；Ｃａｔ　＃　１００－１９）を添加したＤＭＥＭ：Ｆ１２（Ｉｎｖｉｔｒｏｇｅｎ；Ｃａｔ　＃　１１３３０－０３２）を毎日供給した。

【０４３４】

分化プロトコルの工程３を４日間にわたって実施した。全ての処理群の細胞に、１％のＢ２７（Ｉｎｖｉｔｒｏｇｅｎ；Ｃａｔ　＃：１７５０４－０４４）、５０ｎｇ／ｍＬのＦＧＦ７、１００ｎｇ／ｍＬのノギン（Ｒ＆Ｄ　Ｓｙｓｔｅｍｓ；Ｃａｔ　＃　３３４４－ＮＧ）、２５０ｎＭのＫＡＡＤ－シクロパミン（Ｃａｌｂｉｏｃｈｅｍ；Ｃａｔ　＃　２３９８０４）、及び２μＭのオールトランスレチノイン酸（ＲＡ）（Ｓｉｇｍａ－Ａｌｄｒｉｃｈ；Ｃａｔ　＃　Ｒ２６２５）を添加したＤＭＥＭ－高グルコース（Ｉｎｖｉｔｒｏｇｅｎ；Ｃａｔ　＃　１０５６９）を毎日供給した。

【０４３５】

分化プロトコルの工程４を三日間にわたって実施した。全ての処理群の細胞に、最初の２日間は１％のＢ２７、１００ｎｇ／ｍＬのノギン、及び１μＭのＡＬＫ５インヒビター（Ａｘｘｏｒａ；Ｃａｔ　＃　ＡＬＸ－２７０－４４５）、及び１００ｎｇ／ｍＬのＧＤ

Ｆ－８（Ｒ＆Ｄ Ｓｙｓｔｅｍｓ；Ｃａｔ ＃ ７８８－Ｇ８）を添加したＤＭＥＭ－高グルコースを毎日供給した。工程４の３日目に、細胞を２０μＬチップ（Ｒａｉｎｉｎ；Ｃａｔ ＃ ＲＴ－Ｌ１０Ｆ）とセルスクレーパー（Ｃｏｒｎｉｎｇ；Ｃａｔ ＃ ３００８）を用いて６ウェルプレートから回収し、５０ｍＬチューブへと移した。重力により細胞を沈降させ、細胞ペレットを乱さずに上清を吸引した。１％のＢ２７、１００ｎｇ／ｍＬのノギン、及び１μＭのＡＬＫ５インヒビターを添加したＤＭＥＭ－高グルコースに細胞を再懸濁し、次いで６ウェルＣｏｓｔａｒ Ｕｌｔｒａ Ｌｏｗ Ａｔｔａｃｈｍｅｎｔ Ｍｉｃｒｏｐｌａｔｅｓ（Ｃｏｒｎｉｎｇ Ｉｎｃ．，Ｃａｔ ＃ ３４７１）で一晩培養した。翌日、培養懸濁液中の細胞を回収して計数した。移植には、$１０×１０^{6}$個細胞／マウスのアリコートを使用した。ＲＴ－ＰＣＲ解析用には、細胞$０．５×１０^{6}$個のアリコートを回収した。

【０４３６】

図２４Ａは、各処理群のそれぞれの工程１の終了時に生成した胚体内胚葉細胞についての、フローサイトメトリーの結果を示す。ＧＤＦ－８とＷｎｔ３ａでの処理又はＧＤＦ－８と化合物４０での処理についての結果は、工程１の終了時に同様のレベルのＣＸＣＲ４を発現させ、同等でありかつ確実である、細胞の胚体内胚葉集団が各処理群から得られたことを示唆した。２つ組複製処理セットは強い一致を示した。分化プロトコルの工程４の終了時の、移植前ＲＴ－ＰＣＲ解析の結果を、図２４Ｂに示す。ＧＤＦ－８とＷｎｔ３ａ、又はＧＤＦ－８と化合物４０を用いることにより膵臓内胚葉（ＰＥ）へと分化させた細胞は、膵臓内胚葉系に特徴的なマーカー（ＣＤＸ２、ＭａｆＡ、Ｎｇｎ３、ＮＫＸ６．１、Ｐｄｘ－１及びＰｔｆ１Ａ）を同レベルで発現していた。これらの結果は、ＧＤＦ－８とＷｎｔ３ａ、又はＧＤＦ－８と本発明の化合物を利用する分化プロトコルは、細胞の膵臓内胚葉前駆体集団を作製するのに効果的であったことを立証する。分化プロトコルは、２つの独立した、ただし同一の処理セットで実施した。２つ組複製処理セットから得られた結果は、ＲＴ－ＰＣＲ解析により示されるように、強い一致を示した。

【０４３７】

マウスへのヒト胚性幹細胞の移植：５～６週齢のオスのｓｃｉｄ－ｂｅｉｇｅマウス（Ｃ．Ｂ－Ｉｇｈ－１ｂ／ＧｂｍｓＴａｃ－$Ｐｒｋｄｃ^{scid}$－$Ｌｙｓｔ^{bg}$Ｎ７）をＴａｃｏｎｉｃ Ｆａｒｍｓより購入した。滅菌した餌と水を自由に利用できるような状態で、マウスをｍｉｃｒｏｉｓｏｌａｔｏｒケージ内に収容した。外科手術の準備に、マウスをイヤータグで同定し、体重を測定し、手持ち式ｇｌｕｃｏｍｅｔｅｒ（ＬｉｆｅＳｃａｎ；Ｏｎｅ Ｔｏｕｃｈ）を用いて血糖を測定した。外科手術の日に、マウスにイソフルランと酸素の混合物で麻酔をかけ、手術部位を小動物用はさみで剪毛した。マウスには手術前に皮下に０．１ｍｇ．ｋｇ Ｂｕｐｒｅｎｅｘを投与した。７０％イソプロピルアルコール、１０％ポビドンヨード、及び７０％イソプロピルアルコールで連続的に洗浄して手術部位の用意をし、皮膚層と筋層を貫通させて左側方切開部を作製した。左腎を露出させ、０．９％塩化ナトリウムで保湿させた。２４Ｇ×$^{3}/_{4}$”Ｉ．Ｖ．カテーテルを使用して腎臓被膜を貫通させた後、針を除去した。次いで腎臓被膜下でカテーテルを腎臓の遠位極まで前進させた。マウスの手術前準備の間に、移植用の細胞を１．５ｍＬ遠心管で遠心し、次いで細胞のペレットを回収するのに十分な量の培地を残しながらほとんどの上清を除去した。細胞をＲａｉｎｉｎ製Ｐｏｓ－Ｄポジティブディスプレイスメント式ピペットチップに回収し、ピペットを反転させて重力により細胞を沈降させた。移植用に充填した細胞調製物を残して過剰な培地を出した。移植のためにＰｏｓ－Ｄピペットチップをカテーテルのハブにしっかりと取り付け、腎臓の遠位極へと供給するために腎臓被膜下でカテーテルを通してピペットから細胞を分配した。カテーテルの内腔に少量の培養培地を流し、残留している任意の細胞を放出させ、カテーテルを引き抜いた。腎臓被膜を低温焼灼でシールし、腎臓を元の解剖学的な位置に戻した。５－０ ｖｉｃｒｙｌを用いて連続縫合により筋を閉じ、皮膚を創傷クリップにより閉じた。マウスから麻酔を取り除き、完全に回復させた。マウスには手術後に１．０ｍｇ．ｋｇ Ｍｅｔａｃａｍを皮下投与した。

【０４３８】

移植の後で、マウスを週に１回秤量し、週に２回血糖を測定した。移植に続き、マウスには様々な間隔で３ｇ／ｋｇグルコースを腹腔内投与し、グルコース注入の６０分後に、ヘパリンを少量含有している遠心管へと後眼窩静脈洞から血液を吸引した。血液を遠心分離し、２本目の遠心管中に血漿を配置し、ドライアイス上で凍らせ、ヒトＣ－ペプチドアッセイを実施するまでの間－８０℃で保管した。ヒトＣ－ペプチドレベルは製造者による取扱説明書に従って、Ｍｅｒｃｏｄｉａ／ＡＬＰＣＯ社の診断用超高感度ＣペプチドＥＬＩＳＡを用いて測定した。各処理群のそれぞれからの細胞を移植したマウスについての、ヒトＣ－ペプチドについてのＥＬＩＳＡ結果を図２９Ｃ及びＤに示す。各処理カテゴリについて、移植後８週間で同様のレベルのヒトＣ－ペプチドが検出可能であったが、これは、相当する内分泌腺前駆体細胞の集団がＧＤＦ－８とＷｎｔ３ａあるいはＧＤＦ－８と本発明の化合物を用いた分化プロトコルから生じ得たことを示す。

【０４３９】

（実施例２０）

胚体内胚葉系に特徴的なマーカーを発現している細胞へのヒト胚性幹細胞の分化に対する、ＣＤＫ、ＧＳＫ３、及びＴＲＫインヒビターの潜在力の評価

ＣＤＫ、ＧＳＫ３、及び／又はＴＲＫシグナル経路に対して特異性を有することが既知である、独占所有権のある１４種の低分子のサブセットを、胚体内胚葉系に特徴的なマーカーを発現している細胞へのヒト胚性幹細胞の分化に対する、潜在力について評価した。

【０４４０】

細胞アッセイ播種：簡潔に述べると、Ｈ１ヒト胚性幹細胞のクラスターを、ｇｒｏｗｔｈ　ｆａｃｔｏｒ－ｒｅｄｕｃｅｄ　ＭＡＴＲＩＧＥＬ（商標）（Ｉｎｖｉｔｒｏｇｅｎ；Ｃａｔ　＃　３５６２３１）をコートした組織培養プラスチック上で増殖させた。細胞を、コラゲナーゼ（Ｉｎｖｉｔｒｏｇｅｎ；Ｃａｔ　＃　１７１０４－０１９）処理及び穏やかな掻爬により継代し、洗浄して残留酵素を除去し、ｇｒｏｗｔｈ　ｆａｃｔｏｒ－ｒｅｄｕｃｅｄ　ＭＡＴＲＩＧＥＬ（商標）（ＢＤ　Ｂｉｏｓｃｉｅｎｃｅｓ；Ｃａｔ　＃　３５６２３１）を１００μＬ／ウェル用量使用してコートした９６ウェルブラックプレート（Ｐａｃｋａｒｄ　ＶｉｅｗＰｌａｔｅｓ；ＰｅｒｋｉｎＥｌｍｅｒ；Ｃａｔ　＃　６００５１８２）上に均一に分散させて１：１（表面積）比で蒔いた。細胞を付着させ、次いで８ｎｇ／ｍＬのｂＦＧＦ（Ｒ＆Ｄ　Ｓｙｓｔｅｍｓ；Ｃａｔ　＃　２３３－ＦＢ）を添加したＭＥＦ馴化培地を毎日供給しながら１～３日経過させ、対数増殖期を回復させた。アッセイの持続時間の間、プレートは加湿したボックス中に３７℃、５％　CO_2で維持した。

【０４４１】

化合物の調製及びアッセイ：表１６に記載の化合物を用いてスクリーニングを実施した。更に、前述の実施例で実証したように、化合物３４を陽性対照として含ませた。化合物は、９６ウェルプレートフォーマットで５ｍＭ原液として利用できるように作製し、１００％　ＤＭＳＯ（Ｓｉｇｍａ；Ｃａｔ　＃　Ｄ２６５０）中に溶解させて、－８０℃で保存した。ライブラリ化合物は更に、２０％　ＤＭＳＯ含有５０ｍＭ　ＨＥＰＥＳ（Ｉｎｖｉｔｒｏｇｅｎ；Ｃａｔ　＃　１５６３０－０８０）で０．２ｍＭの中間濃度へと希釈して、４℃で保存した。試験条件は３つ組複製で実施し、４日間のアッセイ期間にわたって隔日で培地供給した。各ウェルから培養培地を吸引し、続いてＰＢＳ（Ｉｎｖｉｔｒｏｇｅｎ；Ｃａｔ　＃　１４１９０）で３回洗浄して残留増殖因子を除去することで、アッセイを開始した。０．５％　ＦＣＳ（ＨｙＣｌｏｎｅ；Ｃａｔ　＃　ＳＨ３００７０．０３）と１００ｎｇ／ｍＬのＧＤＦ－８（Ｒ＆Ｄ　Ｓｙｓｔｅｍｓ，Ｃａｔ　＃　７８８－Ｇ８）に加えて２．５μＭの化合物を添加したＤＭＥＭ：Ｆ１２基本培地（Ｉｎｖｉｔｒｏｇｅｎ；Ｃａｔ　＃　１１３３０－０３２）を用い、アッセイの初日に１ウェルあたり２００μＬの試験量を加えた。試験サンプルの並行セットを、同一の方法で、ただしＧＤＦ－８を培地に含ませずに処理した。２％　ＦＣＳに加えて１００ｎｇ／ｍＬのＧＤＦ－８（Ｒ＆Ｄ　Ｓｙｓｔｅｍｓ，Ｃａｔ　＃　７８８－Ｇ８）を添加したＤＭＥＭ：Ｆ１２基本培地を用いて、１ウェルあたり１００μＬの試験容量をアッセイの３日目に各ウェルに

加えた。アッセイの初日にＧＤＦ－８処理をしなかった試験サンプルからは、ＧＤＦ－８を除いた。陽性対照サンプルには、ＦＣＳ及び１００ｎｇ／ｍＬヒト組換えアクチビンＡ（ＰｅｐｒｏＴｅｃｈ；Ｃａｔ　＃１２０－１４）を添加した同様の基本培地を含有させ、４日間のアッセイを通して１日目と２日目にＷｎｔ３ａ（２０ｎｇ／ｍＬ）を加えた。陰性対照サンプルには、ＦＣＳを添加したＤＭＥＭ：Ｆ１２基本培地を含有させた。

【０４４２】

ハイコンテンツな解析：４日間の培養の最後に、アッセイプレートをＰＢＳ（Ｉｎｖｉｔｒｏｇｅｎ；Ｃａｔ　＃　１４１９０）で２回洗浄し、４％パラホルムアルデヒド（Ａｌｅｘｉｓ　Ｂｉｏｃｈｅｍｉｃａｌ；Ｃａｔ　＃　ＡＬＸ－３５０－０１１）で室温で２０分間にわたって固定し、次いでＰＢＳで３回洗浄し、０．５％　Ｔｒｉｔｏｎ　Ｘ－１００（Ｓｉｇｍａ；Ｃａｔ　＃　Ｔ８７６０－２）で室温で２０分間にわたって透過処理した。細胞を再度ＰＢＳで３回洗浄し、４％ニワトリ血清（Ｉｎｖｉｔｒｏｇｅｎ；Ｃａｔ　＃　１６１１００８２）のＰＢＳ溶液で、室温で３０分間にわたってブロッキング処理した。一次抗体（ヤギ抗ヒトＳＯＸ１７；Ｒ＆Ｄ　Ｓｙｓｔｅｍｓ；Ｃａｔ　＃　ＡＦ１９２４）を４％ニワトリ血清に１：１００で希釈し、室温で１時間各ウェルに加えた。Ａｌｅｘａ　Ｆｌｕｏｒ４　８８を結合させた二次抗体（ニワトリ抗ヤギＩｇＧ；Ｍｏｌｅｃｕｌａｒ　Ｐｒｏｂｅｓ；Ｃａｔ　＃　ＡＺ１４６７）をＰＢＳに１：２００で希釈し、ＰＢＳで３回洗浄したあとの各サンプルウェルに加えた。核を対比染色するために、４μｇ／ｍＬ　Ｈｏｅｃｈｓｔ　３３３４２（Ｉｎｖｉｔｒｏｇｅｎ；Ｃａｔ　＃　Ｈ３５７０）を室温で１０分間加えた。プレートをＰＢＳで１回洗浄し、撮像のために１００μＬ／ウェルのＰＢＳで残した。

【０４４３】

Ｈｏｅｃｈｓｔ　３３３４２とＡｌｅｘａ　Ｆｌｕｏｒ　４８８とで染色した細胞用に５１００８ｂｓダイクロイックを利用して、ＩＮ　Ｃｅｌｌ　Ａｎａｌｙｚｅｒ　１０００（ＧＥ　Ｈｅａｌｔｈｃａｒｅ）を用いて撮像を実施した。曝露時間は陽性対照ウェル及び二次抗体単独で染色した未処理陰性対照ウェルから最適化した。１ウェルあたり１５視野の撮像を得て、バイオアッセイ及び続く染色手順の間の任意の細胞ロスを補正した。ＩＮ　Ｃｅｌｌ　Ｄｅｖｅｌｏｐｅｒ　Ｔｏｏｌｂｏｘ　１．７（ＧＥ　Ｈｅａｌｔｈｃａｒｅ）ソフトウェアを用いて総細胞数及び総ＳＯＸ１７強度についての測定値を各ウェルから得た。核の分裂は、グレースケールレベル（ベースライン範囲１００～３００）と核の大きさに基づいて判定した。各複製データセットについて平均及び標準偏差を算出した。総ＳＯＸ１７タンパク質発現は、細胞面積によって乗じた細胞の総蛍光値として定義される総強度又は積分強度として記録した。バックグラウンドは、２００～３５００の間のグレースケール範囲の許容基準に基づいて除去した。３つ組複製ウェルから平均値データを収集した。陽性対照に対する被処理ウェルの百分率を計算した。

【０４４４】

このスクリーニングの結果を表１７に示す。４日間の分化プロセスの間にＧＤＦ－８が非存在である場合、有意なＳＯＸ１７発現を誘導した低分子はなかった。化合物３４は実験用対照としての機能を果たし、アクチビンＡとＷｎｔ３ａを用いる陽性対照で観察されるものと同レベルの有意なＳＯＸ１７発現を、ＧＤＦ－８の存在下で誘導した。この実施例で試験した本発明の化合物の残りのものは、ＳＯＸ１７発現を弱く～穏やかに誘導するという範囲の活性を示した。注目すべき、化合物のこのサブセットでの分化活性は、３つの酵素によるシグナル経路の全てについての選択と関連して観察され、明確な作用機序について確証的に決定することは困難であった。

【０４４５】

（実施例２１）

胚体内胚葉系に特徴的なマーカーを発現している細胞の形成を媒介する能力を有する、本発明の化合物の類似体のスクリーニング

本発明の化合物の構造に基づいて、類似体検索を実施し、１１８の類似体を探し出した。一次スクリーニングは、一部の類似体が、アクチビンＡの非存在下で、他の増殖因子と

の組み合わせにより胚体内胚葉分化を誘導する能力を有すると判定した。これらの類似体がまた、ＧＤＦ－８のみとの組み合わせによっても胚体内胚葉分化を誘導し得るかを判定することは重要であった。

【０４４６】

細胞アッセイ播種：簡潔に述べると、Ｈ１ヒト胚性幹細胞のクラスターを、ｇｒｏｗｔｈ ｆａｃｔｏｒ－ｒｅｄｕｃｅｄ ＭＡＴＲＩＧＥＬ（商標）（Ｉｎｖｉｔｒｏｇｅｎ；Ｃａｔ ＃ ３５６２３１）をコートした組織培養プラスチック上で増殖させた。細胞を、コラゲナーゼ（Ｉｎｖｉｔｒｏｇｅｎ；Ｃａｔ ＃ １７１０４－０１９）処理及び穏やかな掻爬により継代し、洗浄して残留酵素を除去し、ｇｒｏｗｔｈ ｆａｃｔｏｒ－ｒｅｄｕｃｅｄ ＭＡＴＲＩＧＥＬ（商標）（ＢＤ Ｂｉｏｓｃｉｅｎｃｅｓ；Ｃａｔ ＃ ３５６２３１）を１００μＬ／ウェル用量使用してコートした９６ウェルブラックプレート（Ｐａｃｋａｒｄ ＶｉｅｗＰｌａｔｅｓ；ＰｅｒｋｉｎＥｌｍｅｒ；Ｃａｔ ＃ ６００５１８２）上に均一に分散させて１：１（表面積）比で蒔いた。細胞を付着させ、次いで８ｎｇ／ｍＬのｂＦＧＦ（Ｒ＆Ｄ Ｓｙｓｔｅｍｓ；Ｃａｔ ＃ ２３３－ＦＢ）を添加したＭＥＦ馴化培地を毎日供給しながら１～３日経過させ、対数増殖期を回復させた。アッセイの持続時間の間、プレートは加湿したボックス中に３７℃、５％ CO_2で維持した。

【０４４７】

化合物の調製及びアッセイ：類似体化合物のライブラリを用いてスクリーニングを実施した。このライブラリからの化合物を、９６ウェルプレートフォーマットで５ｍＭ原液として利用できるように作製し、１００％ ＤＭＳＯ（Ｓｉｇｍａ；Ｃａｔ ＃ Ｄ２６５０）中に溶解させて、－８０℃で保存した。ライブラリ化合物は更に、２０％ ＤＭＳＯ含有５０ｍＭ ＨＥＰＥＳ（Ｉｎｖｉｔｒｏｇｅｎ；Ｃａｔ ＃ １５６３０－０８０）で０．２ｍＭの中間濃度へと希釈して、４℃で保存した。試験条件は３つ組複製で実施し、４日間のアッセイ期間にわたって隔日で供給した。各ウェルから培養培地を吸引し、続いてＰＢＳ（Ｉｎｖｉｔｒｏｇｅｎ；Ｃａｔ ＃ １４１９０）で３回洗浄して残留増殖因子を除去することで、アッセイを開始した。０．５％ ＦＣＳ（ＨｙＣｌｏｎｅ；Ｃａｔ ＃ ＳＨ３００７０．０３）及び２００ｎｇ／ｍＬのＧＤＦ－８（Ｒ＆Ｄ Ｓｙｓｔｅｍｓ，Ｃａｔ ＃ ７８８－Ｇ８）に加えて２．５μＭの化合物を添加したＤＭＥＭ：Ｆ１２基本培地（Ｉｎｖｉｔｒｏｇｅｎ；Ｃａｔ ＃ １１３３０－０３２）を用いて、アッセイの初日に各ウェルに１ウェルあたり２００μＬの試験量を加えた。２％ ＦＣＳに加えて２００ｎｇ／ｍＬのＧＤＦ－８（Ｒ＆Ｄ Ｓｙｓｔｅｍｓ，Ｃａｔ ＃ ７８８－Ｇ８）を添加したＤＭＥＭ：Ｆ１２基本培地を用いて、アッセイの３日目に各ウェルに１ウェルあたり１００μＬの試験量を加えた。陽性対照サンプルには、ＦＣＳ及び１００ｎｇ／ｍＬヒト組換えアクチビンＡ（ＰｅｐｒｏＴｅｃｈ；Ｃａｔ ＃１２０－１４）を添加した同様の基本培地を含有させ、４日間のアッセイを通して１日目と２日目にＷｎｔ３ａ（２０ｎｇ／ｍＬ）を加えた。陰性対照サンプルには、ＦＣＳを添加したＤＭＥＭ：Ｆ１２基本培地を含有させ、１日目と２日目にはＷｎｔ３ａを加えたが、アクチビンＡによる処理は含めなかった。

【０４４８】

ハイコンテンツな解析：４日間の培養の最後に、アッセイプレートをＰＢＳ（Ｉｎｖｉｔｒｏｇｅｎ；Ｃａｔ ＃ １４１９０）で２回洗浄し、４％パラホルムアルデヒド（Ａｌｅｘｉｓ Ｂｉｏｃｈｅｍｉｃａｌ；Ｃａｔ ＃ ＡＬＸ－３５０－０１１）で室温で２０分間にわたって固定し、次いでＰＢＳで３回洗浄し、０．５％ Ｔｒｉｔｏｎ Ｘ－１００（Ｓｉｇｍａ；Ｃａｔ ＃ Ｔ８７６０－２）で室温で２０分間にわたって透過処理した。細胞を再度ＰＢＳで３回洗浄し、４％ニワトリ血清（Ｉｎｖｉｔｒｏｇｅｎ；Ｃａｔ ＃ １６１１００８２）のＰＢＳ溶液で、室温で３０分間にわたってブロッキング処理した。一次抗体（ヤギ抗ヒトＳＯＸ１７；Ｒ＆Ｄ Ｓｙｓｔｅｍｓ；Ｃａｔ ＃ ＡＦ１９２４）を４％ニワトリ血清に１：１００で希釈し、室温で１時間各ウェルに加えた。Ａｌｅｘａ Ｆｌｕｏｒ ４８８を結合させた二次抗体（ニワトリ抗ヤギＩｇＧ；Ｍｏ

ｌｅｃｕｌａｒ　Ｐｒｏｂｅｓ；Ｃａｔ　＃　ＡＺ１４６７）をＰＢＳに１：２００で希釈し、ＰＢＳで３回洗浄したあとの各サンプルウェルに加えた。核を対比染色するために、４μｇ／ｍＬ　Ｈｏｅｃｈｓｔ　３３３４２（Ｉｎｖｉｔｒｏｇｅｎ；Ｃａｔ　＃　Ｈ３５７０）を室温で１０分間加えた。プレートをＰＢＳで１回洗浄し、撮像のために１００μＬ／ウェルのＰＢＳで残した。

【０４４９】

Ｈｏｅｃｈｓｔ　３３３４２とＡｌｅｘａ　Ｆｌｕｏｒ　４８８とで染色した細胞用に５１００８ｂｓダイクロイックを利用して、ＩＮ　Ｃｅｌｌ　Ａｎａｌｙｚｅｒ　１０００（ＧＥ　Ｈｅａｌｔｈｃａｒｅ）を用いて撮像を実施した。曝露時間は陽性対照ウェル及び二次抗体単独で染色した未処理陰性対照ウェルから最適化した。１ウェルあたり１５視野の撮像を得て、バイオアッセイ及び続く染色手順の間の任意の細胞ロスを補正した。ＩＮ　Ｃｅｌｌ　Ｄｅｖｅｌｏｐｅｒ　Ｔｏｏｌｂｏｘ　１．７（ＧＥ　Ｈｅａｌｔｈｃａｒｅ）ソフトウェアを用いて総細胞数及び総ＳＯＸ１７強度についての測定値を各ウェルから得た。核の分裂は、グレースケールレベル（ベースライン範囲１００～３００）と核の大きさに基づいて判定した。各複製データセットについて平均及び標準偏差を算出した。総ＳＯＸ１７タンパク質発現は、細胞面積によって乗じた細胞の総蛍光値として定義される総強度又は積分強度として記録した。バックグラウンドは、２００～３５００の間のグレースケール範囲の許容基準に基づいて除去した。総強度データは、各ウェルについての総強度を陽性対照についての平均総強度で除することにより正規化した。各複製セットについて、平均及び標準偏差用に正規化データを算出した。

【０４５０】

この単独の実験での４つのアッセイプレートからのスクリーニング結果を、表１８に示す。アクチビンＡとＷｎｔ３ａによる陽性対照処理に対する百分率として、ＳＯＸ１７発現について化合物を等級づけした。本アッセイは、表１９で示されるように１２種の新しい類似体のリストを同定した。

【０４５１】

（実施例２２）

マイクロキャリア上で増殖させたヒト胚性幹細胞は、本発明の方法に従って、胚体内胚葉系に特徴的なマーカーを発現している細胞へと分化させることができる

スケーラブルな条件下での、大量の内分泌細胞の分化と生成を目的として、本発明の方法を用いることでヒト胚性幹細胞がマイクロキャリアビーズ上で増殖し、胚体内胚葉へと分化し得ることを示すことは重要であった。

【０４５２】

アッセイ用の細胞の調製及び分化：米国特許出願番号第６１／１１６，４４７号に記載の方法に従って、１２５ｍＬスピナーフラスコ内で、Ｈ１　ｐ４９Ｃ３細胞をルーチン的にＣｙｔｏｄｅｘ3ビーズ（ＧＥ　Ｈｅａｌｔｈｃａｒｅ　Ｌｉｆｅ　Ｓｃｉｅｎｃｅｓ，ＮＪ）上で増殖させた。７日後、細胞とビーズを１ウェルあたり３０ｃm^2のビーズ面積の比で６ウェルプレート（製造供給元；Ｃａｔ　＃　ＸＸＸ）に移し、プレートをｒｏｃｋｉｎｇ　ｐｌａｔｆｏｒｍに配置した。陽性対照処理ウェル（ＡＡ／Ｗｎｔ３ａを指定）内のビーズ上の細胞は、２％脂肪酸不含ＢＳＡ（ＭＰ　Ｂｉｏｍｅｄｉｃａｌｓ，Ｉｎｃ；Ｃａｔ　＃　１５２４０１）含有ＲＰＭＩ－１６４０（Ｉｎｖｉｔｒｏｇｅｎ；Ｃａｔ　＃：２２４００）を２ｍＬ／ウェル用い、これに１００ｎｇ／ｍＬのアクチビンＡ（ＰｅｐｒｏＴｅｃｈ；Ｃａｔ　＃１２０－１４）と２０ｎｇ／ｍＬのＷｎｔ３ａ（Ｒ&Ｄ　Ｓｙｓｔｅｍｓ；Ｃａｔ　＃　１３２４－ＷＮ／ＣＦ）を２日間添加し、続いて１００ｎｇ／ｍＬのアクチビンＡと８ｎｇ／ｍＬのｂＦＧＦ（ＰｅｐｒｏＴｅｃｈ　Ｉｎｃ．；Ｃａｔ　＃：１００－１８Ｂ）を１日添加することで分化した。任意の他の増殖因子処理は非存在の状態で、３日間にわたって、２％脂肪酸不含ＢＳＡ含有ＲＰＭＩ－１６４０での陰性対照処理ウェル（ＣＭＰ単独を指定）に、化合物３４を最終濃度２．５μＭで加えた。第３処理ウェル（ＣＭＰ＋８を指定）（２ｍＬ／ウェル）には、２％脂肪酸不含ＢＳＡ含有ＲＰＭＩ－１６４０に、３日間にわたって２．５μＭの化合物３４に加え５０ｎ

ｇ／ｍＬのＧＤＦ－８（Ｒ＆Ｄ　Ｓｙｓｔｅｍｓ，Ｃａｔ　＃　７８８－Ｇ８）を入れた。第４処理剤ウェル（ＣＭＰ＋８＋Ｄを指定）（２ｍＬ／ウェル）には、２％脂肪酸不含ＢＳＡ含有ＲＰＭＩ－１６４０に、3日間にわたって２．５μＭの化合物３４と、５０ｎｇ／ｍＬのＧＤＦ－８及び５０ｎｇ／ｍＬのＰＤＧＦ－Ｄを入れた。第５処理剤ウェル（ＣＭＰ＋８＋Ｄ＋Ｖを指定）（２ｍＬ／ウェル）には、２％脂肪酸不含ＢＳＡ含有ＲＰＭＩ－１６４０に、3日間にわたって２．５μＭの化合物３４と、５０ｎｇ／ｍＬのＧＤＦ－８及び５０ｎｇ／ｍＬのＰＤＧＦ－Ｄ、並びに５０ｎｇ／ＶＥＧＦを入れた。第６処理剤ウェル（ＣＭＰ＋８＋Ｄ＋Ｖ＋Ｍを指定）（２ｍＬ／ウェル）には、２％脂肪酸不含ＢＳＡ含有ＲＰＭＩ－１６４０に、3日間にわたって２．５μＭの化合物３４と、５０ｎｇ／ｍＬのＧＤＦ－８、５０ｎｇ／ｍＬのＰＤＧＦ－Ｄ、５０ｎｇ／ｍＬのＶＥＧＦ及び２０ｎｇ／ｍＬムシモールを入れた。全ての培地及び処理剤は毎日交換した。

【０４５３】

処理及び培養の終了時に、米国特許出願番号第６１／１１６，４４７号に記載の方法に従って、細胞をビーズから回収した。回収した細胞を、上記の方法に従いフローサイトメトリーによって計数し、解析した。

【０４５４】

結果を図２５に示す。パネルＡに示すように、分化処理をした全ての処理群について、同様の数の細胞が回収された。パネルＢに示すように、化合物３４単独で処理した細胞はＣＸＣＲ４陽性細胞へと分化しなかった。分化処理時にアクチビンＡとＷｎｔ３ａを加える陽性対照処理では、得られる細胞集団の６８％でＣＸＣＲ４の発現が誘導された。様々な増殖因子の組み合わせを加えた化合物３４は、平均して細胞の５０％にＣＸＣＲ４発現を誘導した。注目すべきことに、同レベルのＣＸＣＲ４発現が、化合物３４と、単独の増殖因子、ＧＤＦ－８との組み合わせによる処理時に、又はＧＤＦ－８を含む複数の増殖因子との組み合わせによる処理時に観察された。これは、少なくともＧＤＦ－８と組み合わせた化合物３４が、アクチビンＡ及びＷｎｔ３ａを代替して胚体内胚葉分化を促進し得ることを立証する。本実施例はまた、本処理法がマイクロキャリアビーズ上での細胞の増殖及び分化に効果的であることを示す。

【０４５５】

（実施例２３）

ＧＤＦ－８と共にある本発明の化合物は、細胞増殖を促進する

前述の実施例は、胚体内胚葉系に特徴的なマーカーを発現している細胞へヒト胚性幹細胞を分化させるのに、ＧＤＦ－８がアクチビンＡと置換し得ることを示した。胚体内胚葉形成に関してのＧＤＦ－８及びアクチビンＡの相対的な作用強度を知ることは重要であった。ヒト胚性幹細胞の分化時に得られる結果について比較するために、等濃度の各増殖因子を用いて用量応答アッセイを実施した。

【０４５６】

胚体内胚葉分化時にＧＤＦ－８と組み合わせて使用した本発明の化合物を、その細胞増殖誘導能について評価した。結果をアクチビンＡ又はＧＤＦ－８単独での処理と比較した。

【０４５７】

アッセイのための細胞の調製：ヒト胚性幹細胞（Ｈ１ヒト胚性幹細胞株）の保存培養物は、ｇｒｏｗｔｈ　ｆａｃｔｏｒ－ｒｅｄｕｃｅｄ　ＭＡＴＲＩＧＥＬ（商標）（ＢＤ　Ｂｉｏｓｃｉｅｎｃｅｓ；Ｃａｔ　＃　３５６２３１）でコートしたディッシュ上のＭＥＦ馴化培地中で、未分化の多能性状態のまま、平均して各４日ごとに継代しながら維持した。継代は、細胞培養物を１ｍｇ／ｍＬディスパーゼ（Ｉｎｖｉｔｒｏｇｅｎ，Ｃａｔ　＃：１７１０５－０４１）溶液に３７℃で５～７分間曝露して、続いて単層をＭＥＦ馴化培地ですすぎ、穏やかにかき取り、細胞クラスターを回収することにより実施した。クラスターを低速度で遠心して細胞ペレットを回収し、残留ディスパーゼを除去した。細胞クラスターはルーチン的な維持培養については１：３比又は１：４比で、あるいは直接アッセイについては１：１比で継代した。全てのヒト胚性幹細胞株は５０未満の継代数で維持

し、正常な核表現型について及びマイコプラズマ汚染の非存在について、ルーチン的に評価した。

【０４５８】

本アッセイで使用した細胞クラスターは、８ｎｇ／ｍＬのｂＦＧＦを添加したＭＥＦ馴化培地に均一に再懸濁し、ｇｒｏｗｔｈ　ｆａｃｔｏｒ－ｒｅｄｕｃｅｄ　ＭＡＴＲＩＧＥＬ（商標）でコートした９６ウェルＰａｃｋａｒｄ　ＶＩＥＷＰＬＡＴＥＳ（ＰｅｒｋｉｎＥｌｍｅｒ；Ｃａｔ　＃　６００５１８２）上に１００μＬ／ウェルの用量を播種した。８ｎｇ／ｍＬのｂＦＧＦを添加したＭＥＦ馴化培地を最初の播種及び増殖に使用した。使用した培養培地を各ウェルから吸引し、等量の新鮮な培地と交換することで毎日の培地供給を実施した。各アッセイプレートにおけるウェルのバックグラウンドセットには細胞を播種しなかったが、アッセイの間、基本培地での処理は行った。アッセイの持続時間の間、プレートは加湿したボックス中に３７℃、５％　CO_2で維持した。

【０４５９】

アッセイ：各ウェルから培養培地を吸引し、試験培地の最終アリコート（１００μＬ）を加えて戻すことでアッセイを開始した。毎日各ウェルから培地を吸引し、新鮮な試験培地と交換することで培地供給しながら、三つ組複製で、全部で３日間のアッセイ期間にわたる試験条件を実施した。２４、４８、及び７２時間での評価のために、同一のアッセイを並行して同時に開始した。

【０４６０】

アッセイの初日に、細胞を含有している全てのウェルに、２．５％ウシ血清アルブミンフラクションＶ、脂肪酸不含（ＦＡＦ　ＢＳＡ；最終アッセイ中２％）（Ｐｒｏｌｉａｎｔ　Ｉｎｃ．Ｃａｔ　＃：ＳＫＵ　６８７００）を添加したＲＰＭＩ－１６４０培地（Ｉｎｖｉｔｒｏｇｅｎ；Ｃａｔ　＃：２２４００）のアリコート（８０μＬ）を入れた。様々な対照及び試験サンプルを５ｘ濃度で作製し、適切なウェルに加えた（ウェルあたり２０μＬ）。対照条件には、最終増殖因子濃度は記載のとおりの以下のものを含有させた：１）２％　ＦＡＦ　ＢＳＡ含有基本培地；２）１００ｎｇ／ｍＬのアクチビンＡ（ＰｅｐｒｏＴｅｃｈ；Ｃａｔ　＃１２０－１４）と８ｎｇ／ｍＬのｂＦＧＦ（ＰｅｐｒｏＴｅｃｈ；Ｃａｔ　＃　１００－１８Ｂ）；３）１００ｎｇ／ｍＬのアクチビンＡと８ｎｇ／ｍＬのｂＦＧＦ及び２０ｎｇ／ｍＬのＷｎｔ３ａ（Ｒ＆Ｄ　Ｓｙｓｔｅｍｓ；Ｃａｔ　＃　１３２４－ＷＮ／ＣＦ）；４）１００ｎｇ／ｍＬのＧＤＦ－８（Ｒ＆Ｄ　Ｓｙｓｔｅｍｓ，Ｃａｔ　＃　７８８－Ｇ８）と８ｎｇ／ｍＬのｂＦＧＦ；５）ＧＤＦ－８と８ｎｇ／ｍＬのｂＦＧＦ及び２０ｎｇ／ｍＬのＷｎｔ３ａ。対照ウェルの追加のセット中の細胞は、アッセイを通してＭＥＦ馴化培地で処理した。ＧＤＦ－８を用いる対照サンプルの一部では、Ｗｎｔ３ａを本発明の化合物と換えた。実験用の試験サンプルのために、８種の異なる化合物を連続２倍段階希釈して３つの異なる投与濃度を作製し、次いで１００ｎｇ／ｍＬのＧＤＦ－８及び８ｎｇ／ｍＬのｂＦＧＦと組み合わせた。これらの低分子としては、独占所有権のある化合物である化合物１８１、化合物１８０、化合物１９、化合物２０２、化合物４０、化合物３４、化合物５６、及び市販のＧＳＫ３インヒビターＢＩＯ（ＥＭＤ　Ｃｈｅｍｉｃａｌｓ，Ｉｎｃ．；Ｃａｔ　＃　３６１５５０）が含まれた。アッセイの２日目及び３日目に、対照及び試験サンプルの全てのウェルを吸引し、同一処理条件を使用して（ただしＷｎｔ３ａは一部の対照ウェルからは外して）再度培地供給した。

【０４６１】

ＭＴＳアッセイ：培養の２４、４８、７２時間の経過後に、１組のアッセイプレートを製造者による取扱説明書に従ってＭＴＳアッセイ（Ｐｒｏｍｅｇａ；Ｃａｔ＃　Ｇ３５８１）にかけた。手短に述べると、ＯＤ４９０値を読み取る前に、２０μＬのＭＴＳを各ウェルに添加し、アッセイプレートを３７℃、５％　CO_2で４時間にわたってインキュベートした。各３つ組複製セットの平均値に加えて、標準誤差を測定するために、統計的な測定値からバックグラウンド（すなわち、細胞を含まない処理ウェル）の値を減算した。

【０４６２】

ＭＴＳアッセイは、ホルマザン産物へのテトラゾリウム化合物の酵素的還元による、細

胞代謝活性の測定法である。単一の時点で、ＭＴＳアッセイは細胞生存率の相対的な指標として使用できる。ＭＴＳアッセイの並行した経時時点での評価は、細胞代謝活性の増加に関しての更なる情報を加えることができ、これは次には各処理条件についての細胞数と相関させることができる。図２６のパネルＡは、アッセイ期間の３日間後の全ての対照処理についてのＯＤ４９０読み取り値を示す。条件培地で処理した細胞が、３日後にＯＤ４９０にほんのわずかな変化を示したことは、この処理群の細胞数が変化なくとどまったことを意味する。対照的に、増殖因子不含の基本培地で培養した細胞（非処理）は、経時的な細胞数の低下に相関してＯＤ４９０の着実な減少を示した。分化プロセスの間の、Ｗｎｔ３ａ含有及び非含有のアクチビンＡ処理は、細胞集団の経時的な有意な増加を意味する、ＯＤ４９０の漸増的な増加を示した。Ｗｎｔ３ａの非存在下でのＧＤＦ－８処理は、アクチビンＡ処理と比較してＯＤ４９０の減少をもたらした；これは培養の初日に顕著であり、培養の全３日間を通して持続した。ＧＤＦ－８処理群へのＷｎｔ３ａの追加は、培養の３日目にＯＤ４９０の回復と増加をもたらした。

【０４６３】

図２６のパネルＢ～図２６のパネルＩまでを通して、ＧＤＦ－８と組み合わせての低分子阻害剤での処理についての、ＭＴＳアッセイの結果を示す。本発明の化合物及びＧＤＦ－８での処理から得られたＯＤ４９０読み取り値は、アクチビンＡでの処理から得られた結果と同等であるか、あるいはそれを超えるものであった。全てのケースで、ＧＤＦ－８と組み合わせた最適濃度の各低分子は、３日間のアッセイ後に、ＧＤＦ－８単独での処理と比べてＯＤ４９０読み取り値の改善をもたらした。このことは、本発明の化合物は、胚体内胚葉分化時に、増殖及び細胞集団の拡大を誘導するのに重要であるということを示唆する。

【０４６４】

（実施例２４）

マイクロキャリア上で増殖させたヒト胚性幹細胞は、本発明の方法に従って、内分泌腺前駆細胞へと分化させることができる

工業的な条件下での、大量の内分泌細胞の分化及び生成を目的として、アクチビンＡを不含のプロトコルを用いることでヒト胚性幹細胞がマイクロキャリアビーズ上で増殖し、内分泌腺前駆細胞へと分化し得ることを示すことは重要であった。

【０４６５】

アッセイのための細胞の調製及び分化：Ｈ１　ｐ４５細胞を、１０秒毎に約１回回旋するｒｏｃｋｉｎｇ　ｐｌａｔｆｏｒｍ（Ｖａｒｉ　Ｍｉｘ，Ｔｈｅｒｍｏ　Ｓｃｉｅｎｔｉｆｉｃ，Ｃａｔ＃Ｍ７９７３５）上に配置した6ウェル超低接着プレート（Ｃｏｓｔａｒ；Ｃａｔ　＃３４７１）内にて、Ｃｙｔｏｄｅｘ3ビーズ（GE　Ｈｅａｌｔｈｃａｒｅ；Ｃａｔ　＃　１７－０４８５－０１）上に増殖させた。ＭＥＦ馴化培地を６日間にわたって毎日交換した。次いで、内胚葉分化を開始させるために培地を以下の処理剤へと変更した。陽性対照処理ウェル（ＡＡ＋Ｗｎｔを指定）内のビーズ上の細胞は、２％脂肪酸不含ＢＳＡ（Ｐｒｏｌｉａｎｔ　Ｂｉｏｍｅｄｉｃａｌｓ，Ｉｎｃ；ＳＫＵ　＃　６８７００）含有ＲＰＭＩ－１６４０（Ｉｎｖｉｔｒｏｇｅｎ；Ｃａｔ　＃：２２４００）を2ｍＬ／ウェル用い、これに１００ｎｇ／ｍＬのアクチビンＡ（ＰｅｐｒｏＴｅｃｈ；Ｃａｔ　＃１２０－１４）と8ｎｇ／ｍＬのｂＦＧＦ（ＰｅｐｒｏＴｅｃｈ　Ｉｎｃ．；Ｃａｔ　＃：１００－１８Ｂ）と２０ｎｇ／ｍＬのＷｎｔ３ａ（R&D　Ｓｙｓｔｅｍｓ；Ｃａｔ　＃　１３２４－WN／ＣＦ）を１日添加し、続いて１００ｎｇ／ｍＬのアクチビンAと8ｎｇ／ｍＬのｂＦＧＦ（ＰｅｐｒｏＴｅｃｈ　Ｉｎｃ．；Ｃａｔ　＃：１００－１8Ｂ）を２日間添加することで分化した。第2の処理ウェル（ＧＤＦ－８＋ＭＣＸを指定）には2．５μＭの化合物２０２に加えて２００ｎｇ／ｍＬのＧＤＦ－８（R&D　Ｓｙｓｔｅｍｓ，Ｃａｔ　＃　７８８－Ｇ８）と8ｎｇ／ｍＬのｂＦＧＦを１日目に、続く2日間には加えて２００ｎｇ／ｍＬのＧＤＦ－８及び８ｎｇ／ｍＬのｂＦＧＦを含有する、２％脂肪酸不含ＢＳＡ含有ＲＰＭＩ－１６４０（2ｍＬ／ウェル）培地を入れた。第3の処理ウェル（ＧＤＦ－８＋Ｗｎｔを指定）には２００ｎｇ／ｍＬのＧＤＦ－８と２０ｎｇ

／ｍＬのＷｎｔ３ａ及び８ｎｇ／ｍＬのｂＦＧＦを１日目に、続く２日間には加えて２００ｎｇ／ｍＬのＧＤＦ－８及び８ｎｇ／ｍＬのｂＦＧＦを含有する、２％脂肪酸不含ＢＳＡ含有ＲＰＭＩ－１６４０（２ｍＬ／ウェル）培地を入れた。全ての培地及び処理剤は毎日交換した。

【０４６６】

処理及び培養の終了時に、細胞を回収しかつ計数することで細胞の回収率を判定し、フローサイトメトリー解析を実施した。高レベルのＣＸＣＲ４及びＣＤ９９が３つの処理レジメン全てで見られた（図２７Ａ）。細胞数はサンプル間で変動した（図２７Ｂ）。胚体内胚葉及び第４ステージにおいてＧＤＦ－８で処理したサンプルでは、他の処理群よりも少ない細胞数が観察された。これは本発明の化合物が、分化時の細胞増殖を増加させ得ることを示唆する。

【０４６７】

ステージ３の終了時では、内胚葉遺伝子ＰＤＸ１、ＨＮＦ４α、及びＣＤＸ２が細胞中で発現する（図２７Ｃ、Ｄ）。分化ステージ１の間の、ＧＤＦ－８及び本発明の化合物での細胞の処理は、対照分化処理と比較してＰｄｘ１のより良好な発現をもたらした。ステージ４の終了時では、内胚葉遺伝子が更に上方制御されていた（図２７Ｅ、Ｆ）。これらの結果は、ＧＤＦ－８に加えて化合物２０２が、膵臓内胚葉形成をもたらす胚体内胚葉分化に関してアクチビンＡとＷｎｔ３ａとを代替できると結論付ける。

【０４６８】

本明細書を通して引用された刊行物は、その全体が参照により本明細書に組み込まれる。以上、本発明の様々な態様を実施例及び好ましい実施形態を参照して説明したが、本発明の範囲は、上記の説明文によってではなく、特許法の原則の下で適切に解釈される以下の特許請求の範囲によって定義されるものである点は認識されるであろう。

【０４６９】

【表１－１】

表1					
プレート番号	化合物番号	細胞数		Sox17発現	
		平均総細胞数	陽性対照%	平均総強度	陽性対照%
プレート5	アクチビンA不含（Wnt3a含有）	7159	67.42	8.12E+06	2.51
プレート5	アクチビンA／Wnt3a	10619	100.00	3.23E+08	100.00
プレート5	化合物58	4848	45.66	−1.60E+06	−0.49
プレート5	化合物59	20	0.19	−4.62E+06	−1.43
プレート5	化合物60	3348	31.52	−2.33E+05	−0.07
プレート5	化合物61	2931	27.60	−3.05E+06	−0.94
プレート5	化合物62	7171	67.53	−2.04E+06	−0.63
プレート5	化合物3	14211	133.82	−2.34E+06	−0.73
プレート6	アクチビンA不含（Wnt3a含有）	3264	32.97	2.52E+06	0.80
プレート6	アクチビンA／Wnt3a	9902	100.00	3.14E+08	100.00
プレート6	化合物63	1917	19.36	4.75E+05	0.15
プレート6	化合物26	5434	54.88	−6.33E+05	−0.20
プレート6	化合物27	6288	63.50	−1.13E+06	−0.36
プレート6	化合物28	4121	41.62	−1.89E+06	−0.60
プレート6	化合物29	5164	52.15	−1.66E+06	−0.53
プレート6	化合物30	4726	47.73	−1.23E+06	−0.39
プレート7	アクチビンA不含（Wnt3a含有）	9545	47.57	−4.87E+06	−0.99
プレート7	アクチビンA／Wnt3a	20064	100.00	4.92E+08	100.00
プレート7	化合物31	7230	36.03	−3.45E+06	−0.70
プレート7	化合物32	14655	73.04	−3.03E+06	−0.62
プレート7	化合物33	13891	69.23	−8.11E+06	−1.65
プレート7	化合物34	11674	58.18	−2.24E+06	−0.46
プレート7	化合物35	15379	76.65	−7.30E+06	−1.48
プレート7	化合物36	8356	41.65	−4.57E+06	−0.93
プレート8	アクチビンA不含（Wnt3a含有）	6868	36.97	−2.31E+06	−0.52
プレート8	アクチビンA／Wnt3a	18575	100.00	4.47E+08	100.00
プレート8	化合物37	9048	48.71	−3.51E+06	−0.79
プレート8	化合物38	11361	61.16	−4.31E+06	−0.96
プレート8	化合物39	7054	37.98	−3.83E+06	−0.86
プレート8	化合物40	8104	43.63	−4.59E+06	−1.03
プレート1	アクチビンA不含（Wnt3a含有）	2972	27.98	1.64E+07	19.74
プレート1	アクチビンA／Wnt3a	3126	29.44	8.33E+07	100.00
プレート1	化合物64	2201	20.72	1.71E+07	20.52
プレート1	化合物65	3030	28.53	2.83E+07	33.95
プレート1	化合物66	1990	18.74	2.36E+07	28.30
プレート1	化合物67	2074	19.53	2.63E+07	31.55
プレート1	化合物68	1432	13.48	1.03E+07	12.39
プレート1	化合物69	2593	24.42	2.62E+07	31.43

【０４７０】

【表１－２】
（上記表の続き）

表1					
プレート番号	化合物番号	細胞数		Sox17発現	
		平均総細胞数	陽性対照%	平均総強度	陽性対照%
プレート1	化合物72	2179	20.52	1.21E+07	14.50
プレート1	化合物73	2817	26.53	2.93E+07	35.25
プレート1	化合物74	2853	26.86	2.25E+07	27.01
プレート1	化合物75	1689	15.91	1.42E+07	17.05
プレート1	化合物76	2324	21.89	1.48E+07	17.81
プレート1	化合物77	2306	21.71	2.04E+07	24.55
プレート1	化合物78	3298	31.06	2.58E+07	31.00
プレート1	化合物79	2855	26.88	2.79E+07	33.47
プレート1	化合物80	3603	33.93	3.22E+07	38.62
プレート1	化合物81	2263	21.31	1.07E+07	12.91
プレート1	化合物82	1210	11.39	1.36E+07	16.33
プレート1	化合物83	1805	17.00	1.82E+07	21.87
プレート1	化合物84	2024	19.06	2.48E+07	29.80
プレート1	化合物85	2840	26.74	3.45E+07	41.44
プレート1	化合物86	1447	13.63	8.43E+06	10.13
プレート1	化合物87	5336	50.25	4.20E+07	50.38
プレート2	アクチビンA不含（Wnt3a含有）	4033	35.50	2.14E+07	21.70
プレート2	アクチビンA／Wnt3a	4292	37.78	9.86E+07	100.00
プレート2	化合物88	3416	30.06	4.17E+07	42.28
プレート2	化合物89	4751	41.82	2.11E+07	21.40
プレート2	化合物90	4542	39.98	3.03E+07	30.70
プレート2	化合物91	1401	12.33	1.29E+06	1.31
プレート2	化合物92	4210	37.06	2.95E+07	29.90
プレート2	化合物93	4157	36.59	2.29E+07	23.26
プレート2	化合物94	4046	35.61	2.85E+07	28.91
プレート2	化合物95	8368	73.66	4.02E+07	40.72
プレート2	化合物96	3695	32.53	2.92E+07	29.57
プレート2	化合物97	3437	30.26	2.41E+07	24.44
プレート2	化合物98	4178	36.77	3.75E+07	38.07
プレート2	化合物99	3739	32.91	2.10E+07	21.29
プレート2	化合物100	2275	20.02	1.27E+07	12.86
プレート2	化合物101	3496	30.77	2.98E+07	30.17
プレート2	化合物102	4874	42.90	2.10E+07	21.32
プレート2	化合物103	4228	37.22	2.69E+07	27.32
プレート2	化合物104	6115	53.82	4.93E+07	49.99
プレート2	化合物105	6484	57.07	5.03E+07	50.95
プレート2	化合物106	4211	37.06	3.94E+07	40.00
プレート2	化合物107	2853	25.11	1.78E+07	18.04

【０４７１】

【表１－３】
（上記表の続き）

表1					
プレート番号	化合物番号	細胞数		Sox17発現	
		平均総細胞数	陽性対照%	平均総強度	陽性対照%
プレート2	化合物108	3779	33.27	2.39E+07	24.26
プレート2	化合物108	2869	25.26	2.04E+07	20.71
プレート2	化合物110	4398	38.71	2.53E+07	25.65
プレート3	アクチビンA不含（Wnt3a含有）	2589	91.17	1.17E+07	5.89
プレート3	アクチビンA／Wnt3a	6933	244.13	1.98E+08	100.00
プレート3	化合物111	6816	240.04	5.33E+07	26.90
プレート3	化合物112	5357	188.66	3.52E+07	17.74
プレート3	化合物113	6002	211.37	8.55E+07	43.11
プレート3	化合物114	3308	116.49	3.85E+07	19.44
プレート3	化合物115	5007	176.31	3.96E+07	19.95
プレート3	化合物116	3802	133.89	3.12E+07	15.75
プレート3	化合物117	6521	229.64	4.16E+07	20.97
プレート3	化合物118	6128	215.81	5.53E+07	27.91
プレート3	化合物119	4184	147.35	3.41E+07	17.21
プレート3	化合物120	2489	87.66	2.87E+07	14.49
プレート3	化合物121	4985	175.54	3.94E+07	19.87
プレート3	化合物25	4151	146.17	4.03E+07	20.32
プレート3	化合物122	6407	225.61	4.15E+07	20.95
プレート3	化合物123	4465	157.24	5.35E+07	26.99
プレート3	化合物124	4417	155.53	4.67E+07	23.55
プレート3	化合物125	6367	224.23	5.73E+07	28.93
プレート3	化合物126	6157	216.82	7.47E+07	37.70
プレート3	化合物127	5593	196.97	5.61E+07	28.28
プレート3	化合物128	4160	146.50	4.91E+07	24.77
プレート3	化合物129	3778	133.03	3.54E+07	17.88
プレート3	化合物130	4357	153.43	4.15E+07	20.92
プレート3	化合物131	6135	216.05	4.28E+07	21.61
プレート3	化合物132	4421	155.69	4.58E+07	23.12
プレート3	化合物133	7069	248.94	6.52E+07	32.88
プレート4	アクチビンA不含（Wnt3a含有）	3274	86.62	1.25E+07	12.79
プレート4	アクチビンA／Wnt3a	4158	110.03	9.79E+07	100.00
プレート4	化合物134	5277	139.62	3.43E+07	35.04
プレート4	化合物64	5657	149.67	3.38E+07	34.48
プレート4	化合物135	2790	73.83	1.63E+07	16.63
プレート4	化合物34	4774	126.33	4.35E+07	44.47
プレート4	化合物136	4881	129.16	3.20E+07	32.73
プレート4	化合物137	1740	46.05	9.16E+06	9.35
プレート4	化合物30	6367	168.46	4.22E+07	43.13

【０４７２】

【表１－４】

（上記表の続き）

表1					
プレート番号	化合物番号	細胞数		Sox17発現	
		平均総細胞数	陽性対照%	平均総強度	陽性対照%
プレート4	化合物37	5377	142.27	2.85E+07	29.14
プレート4	化合物138	7722	204.32	3.07E+07	31.37
プレート4	化合物139	3574	94.56	1.30E+07	13.32
プレート4	化合物140	3893	103.00	1.12E+07	11.46
プレート4	化合物39	6114	161.77	3.45E+07	35.22
プレート4	化合物141	4310	114.04	1.61E+07	16.48
プレート4	化合物142	5091	134.71	3.74E+07	38.22
プレート4	化合物35	6601	174.65	8.50E+07	86.77
プレート4	化合物143	3582	94.79	2.17E+07	22.14
プレート4	化合物144	6787	179.57	5.45E+07	55.69
プレート4	化合物145	3752	99.29	2.23E+07	22.81
プレート4	化合物146	2554	67.59	1.83E+07	18.71
プレート4	化合物112	3289	87.03	1.48E+07	15.11
プレート4	化合物113	3819	101.06	2.34E+07	23.93
プレート4	化合物114	1259	33.32	1.34E+07	13.67
プレート4	化合物22	5517	145.98	7.09E+07	72.39
プレート4	化合物150	5104	135.04	3.34E+07	34.11
プレート5	アクチビンA不含（Wnt3a含有）	7159	116.70	8.12E+06	2.51
プレート5	アクチビンA／Wnt3a	10619	173.09	3.23E+08	100.00
プレート5	化合物151	2785	45.39	−1.03E+06	−0.32
プレート5	化合物152	4693	76.50	−3.08E+06	−0.95
プレート5	化合物153	9718	158.40	−1.20E+06	−0.37
プレート5	化合物154	3479	56.70	−1.97E+06	−0.61
プレート5	化合物155	9343	152.28	−3.45E+06	−1.07
プレート5	化合物156	3813	62.16	−2.58E+05	−0.08
プレート6	アクチビンA不含（Wnt3a含有）	3264	68.37	2.52E+06	0.80
プレート6	アクチビンA／Wnt3a	9902	207.40	3.14E+08	100.00
プレート6	化合物157	2480	51.94	−1.22E+06	−0.39
プレート6	化合物158	5271	110.41	−1.30E+06	−0.41
プレート6	化合物159	6478	135.68	−1.84E+06	−0.59
プレート6	化合物160	4212	88.21	1.30E+05	0.04
プレート6	化合物161	2439	51.09	−9.20E+05	−0.29
プレート6	化合物162	1260	26.39	−1.35E+06	−0.43
プレート7	アクチビンA不含（Wnt3a含有）	9545	156.12	−4.87E+06	−0.99
プレート7	アクチビンA／Wnt3a	20064	328.17	4.92E+08	100.00
プレート7	化合物163	16557	270.81	−7.31E+06	−1.49

【０４７３】

【表１－５】

（上記表の続き）

表1					
プレート番号	化合物番号	細胞数		Sox17発現	
		平均総細胞数	陽性対照%	平均総強度	陽性対照%
プレート7	化合物164	16472	269.42	−7.37E+06	−1.50
プレート7	化合物165	3015	49.32	−7.34E+06	−1.49
プレート7	化合物166	13845	226.45	−7.98E+06	−1.62
プレート7	化合物167	10325	168.87	−7.35E+06	−1.49
プレート7	化合物168	14139	231.26	−6.49E+06	−1.32
プレート7	化合物169	4468	73.08	−6.38E+06	−1.30
プレート8	アクチビンA不含（Wnt3a含有）	6868	179.83	−2.31E+06	−0.52
プレート8	アクチビンA／Wnt3a	18575	486.35	4.47E+08	100.00
プレート8	化合物170	13140	344.04	−4.13E+06	−0.93
プレート8	化合物171	10894	285.22	−2.61E+06	−0.58
プレート8	化合物172	3416	89.44	−4.72E+06	−1.06
プレート8	化合物173	8815	230.81	−4.25E+06	−0.95
プレート8	化合物174	11760	307.91	−3.33E+06	−0.75
プレート8	化合物175	5	0.13	−4.91E+06	−1.10
プレート8	化合物176	10139	265.47	−4.73E+06	−1.06
プレート8	化合物177	9994	261.68	−2.95E+06	−0.66
プレート8	化合物178	8998	235.58	−3.74E+06	−0.84
プレート5	アクチビンA不含（Wnt3a含有）	7159	67.42	8.12E+06	2.51
プレート5	アクチビンA／Wnt3a	10619	100.00	3.23E+08	100.00
プレート5	化合物21	4719	44.44	−1.96E+06	−0.61
プレート5	化合物22	2036	19.18	−1.79E+06	−0.55
プレート5	化合物23	2563	24.13	−1.56E+06	−0.48
プレート5	化合物24	4470	42.09	−7.05E+05	−0.22
プレート5	化合物24	6085	57.30	−3.08E+06	−0.95
プレート5	化合物26	7276	68.52	−2.38E+06	−0.74
プレート5	化合物27	4588	43.20	−5.63E+05	−0.17
プレート5	化合物28	2682	25.26	−1.37E+06	−0.43
プレート5	化合物29	5778	54.41	−1.94E+06	−0.60
プレート5	化合物30	620	5.84	−5.05E+06	−1.56
プレート5	化合物31	3419	32.19	−1.42E+06	−0.44
プレート6	アクチビンA不含（Wnt3a含有）	3264	69.07	2.52E+06	0.80
プレート6	アクチビンA／Wnt3a	9902	209.51	3.14E+08	100.00
プレート6	化合物32	2142	45.32	−1.33E+06	−0.42
プレート6	化合物33	5564	117.73	−8.63E+05	−0.27
プレート6	化合物34	5927	125.41	−2.01E+06	−0.64
プレート6	化合物35	10068	213.01	−2.15E+06	−0.68
プレート6	化合物36	5170	109.39	−1.22E+06	−0.39
プレート6	化合物37	3098	65.55	1.91E+06	0.61

【０４７４】

【表１－６】
（上記表の続き）

表1					
プレート番号	化合物番号	細胞数		Sox17発現	
		平均総細胞数	陽性対照%	平均総強度	陽性対照%
プレート6	化合物38	1537	32.52	4.48E+04	0.01
プレート6	化合物39	3650	77.23	−2.01E+06	−0.64
プレート6	化合物40	5817	123.07	4.91E+05	0.16
プレート6	化合物64	4359	92.23	−1.07E+05	−0.03
プレート6	化合物30	4035	85.38	2.09E+06	0.66
プレート6	化合物65	3279	69.37	−5.63E+05	−0.18
プレート6	化合物67	2698	57.08	−1.95E+06	−0.62
プレート7	アクチビンA不含（Wnt3a含有）	9545	321.22	−4.87E+06	−0.99
プレート7	アクチビンA／Wnt3a	20064	675.20	4.92E+08	100.00
プレート7	化合物68	10894	366.62	−5.15E+06	−1.05
プレート7	化合物69	9734	327.58	−3.97E+06	−0.81
プレート7	化合物70	16736	563.21	−6.51E+06	−1.32
プレート7	化合物71	17999	605.71	−7.38E+06	−1.50
プレート7	化合物72	7309	245.96	−6.47E+06	−1.32
プレート7	化合物73	8888	299.10	−3.03E+06	−0.62
プレート7	化合物74	11496	386.85	−2.67E+06	−0.54
プレート7	化合物75	9739	327.74	−7.75E+06	−1.57
プレート7	化合物76	14439	485.89	−4.19E+06	−0.85
プレート7	化合物77	12331	414.95	−6.03E+06	−1.22
プレート7	化合物78	9702	326.49	−6.57E+06	−1.33
プレート7	化合物79	8535	287.22	−6.92E+06	−1.41
プレート8	アクチビンA不含（Wnt3a含有）	6868	295.49	−2.31E+06	−0.52
プレート8	アクチビンA／Wnt3a	18575	799.17	4.47E+08	100.00
プレート8	化合物80	13939	599.68	−4.23E+06	−0.95
プレート8	化合物81	10466	450.29	−4.91E+06	−1.10
プレート8	化合物82	10323	444.14	−4.90E+06	−1.10
プレート8	化合物83	14619	628.95	1.48E+06	0.33
プレート8	化合物84	14105	606.84	−4.44E+06	−0.99
プレート8	化合物85	12172	523.66	−3.48E+06	−0.78
プレート8	化合物86	7218	310.54	−4.22E+06	−0.94
プレート8	化合物87	5383	231.58	−4.07E+06	−0.91
プレート8	化合物88	10419	448.27	−4.27E+06	−0.96
プレート8	化合物89	11780	506.83	−3.94E+06	−0.88
プレート8	化合物90	7002	301.25	−1.54E+06	−0.35
プレート8	化合物91	6224	267.78	−4.53E+06	−1.01

【０４７５】

【表２】

表2		
化合物番号	細胞数	Sox17強度
	陽性対照%	陽性対照%
化合物17	133．8	－0．7
化合物95	195．0	40．7
化合物138	185．7	31．4
化合物87	170．7	50．4
化合物144	163．2	55．7
化合物35	158．7	86．8
化合物30	153．1	43．1
化合物105	151．0	51．0
化合物39	147．0	35．2
化合物104	142．5	50．0
化合物29	136．0	34．5
化合物22	132．7	72．4
化合物37	129．3	29．1
化合物134	126．9	35．0
化合物150	122．7	34．1
化合物142	122．4	38．2
化合物136	117．4	32．7
化合物80	115．2	38．6
化合物34	114．8	44．5
化合物102	113．5	21．3
化合物89	110．7	21．4
化合物105	105．8	30．7
化合物78	105．5	31．0
化合物141	103．6	16．5
化合物110	102．5	25．7
化合物133	102．0	32．9

【０４７６】

【表３】

表3						
	処理		細胞数		Sox17発現	
化合物番号			平均総細胞数	陽性対照%	平均総強度	陽性対照%
なし	アクチビンA不含、Wnt3a含有		23253	124.16	1.97E+07	10.59
なし	アクチビンA／Wnt3a		18728	100.00	1.86E+08	100.00
化合物17	AA不含（Wnt3a含有）	EGF＋FGF4	21445	114.51	3.43E+07	18.48
なし	アクチビンA不含、Wnt3a含有		23253	124.16	1.97E+07	10.59
なし	アクチビンA／Wnt3a		18728	100.00	1.86E+08	100.00
化合物22	AA不含（Wnt3a含有）	EGF＋FGF4	18336	97.91	3.72E+07	20.05
化合物34	AA不含（Wnt3a含有）	EGF＋FGF4	18891	100.87	3.26E+07	17.55
化合物29	AA不含（Wnt3a含有）	EGF＋FGF4	20221	107.97	2.83E+07	15.27
化合物39	AA不含（Wnt3a含有）	EGF＋FGF4	17095	91.28	2.82E+07	15.19
化合物37	AA不含（Wnt3a含有）	EGF＋FGF4	15605	83.32	2.67E+07	14.37
化合物35	AA不含（Wnt3a含有）	EGF＋FGF4	23823	127.20	2.54E+07	13.69
化合物80	AA不含（Wnt3a含有）	EGF＋FGF4	19864	106.07	2.33E+07	12.54
化合物141	AA不含（Wnt3a含有）	EGF＋FGF4	17719	94.61	2.24E+07	12.04
化合物30	AA不含（Wnt3a含有）	EGF＋FGF4	18063	96.45	2.18E+07	11.73
化合物150	AA不含（Wnt3a含有）	EGF＋FGF4	16833	89.88	2.16E+07	11.63
化合物144	AA不含（Wnt3a含有）	EGF＋FGF4	17100	91.31	2.04E+07	11.01
化合物104	AA不含（Wnt3a含有）	EGF＋FGF4	17863	95.38	1.89E+07	10.19
化合物142	AA不含（Wnt3a含有）	EGF＋FGF4	18955	101.21	1.84E+07	9.90
化合物110	AA不含（Wnt3a含有）	EGF＋FGF4	17534	93.62	1.76E+07	9.45
化合物78	AA不含（Wnt3a含有）	EGF＋FGF4	17703	94.52	1.71E+07	9.23
化合物133	AA不含（Wnt3a含有）	EGF＋FGF4	16521	88.22	1.67E+07	8.97
化合物87	AA不含（Wnt3a含有）	EGF＋FGF4	16495	88.07	1.55E+07	8.33
化合物95	AA不含（Wnt3a含有）	EGF＋FGF4	16900	90.24	1.43E+07	7.72
化合物136	AA不含（Wnt3a含有）	EGF＋FGF4	19167	102.34	7.91E+06	4.26
化合物105	AA不含（Wnt3a含有）	EGF＋FGF4	15217	81.25	7.45E+06	4.01
化合物134	AA不含（Wnt3a含有）	EGF＋FGF4	17208	91.88	7.40E+06	3.99
化合物138	AA不含（Wnt3a含有）	EGF＋FGF4	16695	89.14	6.65E+06	3.58
化合物89	AA不含（Wnt3a含有）	EGF＋FGF4	14652	78.24	3.89E+06	2.10
化合物90	AA不含（Wnt3a含有）	EGF＋FGF4	15903	84.92	3.53E+06	1.90
化合物102	AA不含（Wnt3a含有）	EGF＋FGF4	12943	69.11	2.85E+05	0.15
なし	アクチビンA不含、Wnt3a含有		23253	124.16	1.97E+07	10.59
なし	アクチビンA／Wnt3a		18728	100.00	1.86E+08	100.00
化合物35	AA不含（Wnt3a含有）	EGF＋FGF4	18294	97.68	1.99E+07	10.70

【０４７７】

【表４】

表3B		
	細胞数	Sox17強度
化合物番号	陽性対照%	陽性対照%
化合物22	97.91	20.05
化合物34	100.87	17.55
化合物29	107.97	15.27
化合物39	91.28	15.19
化合物37	83.32	14.37
化合物35	127.20	13.69

【０４７８】

【表５－１】

表4						
	処理		細胞数		Sox17発現	
化合物番号			平均総細胞数	陽性対照%	平均総強度	陽性対照%
なし	アクチビンA不含(Wnt3a含有)		7107	67.96	−1.27E+07	−7.94
なし	アクチビンA／Wnt3a		10459	100.00	1.60E+08	100.00
化合物17	AA不含(Wnt3a含有)	EGF	6942	73.43	1.27E+06	0.74
化合物17	AA不含(Wnt3a含有)	EGF＋FGF4	5738	60.69	3.14E+06	1.83
化合物17	AA不含(Wnt3a含有)	EGF＋FGF4＋PDGF－AB	4453	47.10	9.30E+05	0.54
化合物17	AA不含(Wnt3a含有)	EGF＋FGF4＋PDGF－AB＋ムシモール	10391	109.91	8.92E+06	5.20
化合物17	AA不含(Wnt3a含有)	EGF＋PDGF－A＋VEGF	5728	60.59	2.14E+06	1.24
化合物17	AA不含(Wnt3a含有)	FGF4＋PDGF－A＋VEGF	13198	139.59	1.29E+07	7.54
化合物17	AA不含(Wnt3a含有)	EGF＋FGF4＋PDGF－A＋VEGF	10480	110.85	8.97E+06	5.23
化合物17	AA不含(Wnt3a含有)	EGF＋FGF4＋PDGF－A＋ムシモール	13649	144.37	1.45E+07	8.43
なし	アクチビンA不含(Wnt3a含有)		3117	34.86	−1.41E+06	−0.72
なし	アクチビンA／Wnt3a		8942	100.00	1.95E+08	100.00
化合物35	AA不含(Wnt3a含有)	EGF	19334	216.23	6.62E+07	33.86
化合物35	AA不含(Wnt3a含有)	PDGF－AB	16662	186.34	4.95E+07	25.33
化合物35	AA不含(Wnt3a含有)	PDGF－A	16885	188.84	4.48E+07	22.94
化合物35	AA不含(Wnt3a含有)	VEGF	18263	204.25	3.51E+07	17.98
化合物35	AA不含(Wnt3a含有)	FGF4	4410	49.32	3.33E+07	17.04
化合物35	AA不含(Wnt3a含有)	ムシモール	18867	211.00	2.61E+07	13.35
化合物35	AA不含(Wnt3a含有)	PDGF－C	16642	186.12	1.85E+07	9.46
化合物35	AA不含(Wnt3a含有)	PDGF－D	17618	197.03	1.84E+07	9.41
化合物35	AA不含(Wnt3a含有)	PDGF－B	14168	158.46	1.52E+07	7.76
化合物35	AA不含(Wnt3a含有)	PD98059	18877	211.11	1.30E+07	6.64
化合物35	AA不含(Wnt3a含有)	BMP1	18849	210.81	1.29E+07	6.59
化合物35	AA不含(Wnt3a含有)	LY294002	18374	205.49	1.03E+07	5.28
化合物35	AA不含(Wnt3a含有)	BMP4	16748	187.31	8.97E+06	4.59
化合物35	AA不含(Wnt3a含有)	BMP2	16218	181.38	8.89E+06	4.55

【０４７９】

【表５－２】

（上記表の続き）

表4						
	処理		細胞数		Sox17発現	
化合物番号			平均総細胞数	陽性対照%	平均総強度	陽性対照%
化合物35	AA不含(Wnt3a含有)	BMP7	20111	224.91	8.05E+06	4.12
化合物35	AA不含(Wnt3a含有)	U0124	16539	184.97	7.54E+06	3.86
化合物35	AA不含(Wnt3a含有)	BMP6	17838	199.50	7.32E+06	3.75
化合物35	AA不含(Wnt3a含有)	BMP2／7	12042	134.67	7.08E+06	3.62
化合物35	AA不含(Wnt3a含有)	ビククリン	19312	215.98	1.95E+06	1.00
化合物35	AA不含(Wnt3a含有)	U0126	19961	223.24	−5.75E+05	−0.29
化合物35	AA不含(Wnt3a含有)	酪酸	14238	159.24	−1.85E+06	−0.94
なし		アクチビンA不含(Wnt3a含有)	6049	45.2	−1.31E+07	−5.2
なし		アクチビンA／Wnt3a	13392	100.0	2.50E+08	100.0
化合物20		EGF、FGF、PDGF－A、VEGF、PDGF－D、ムシモール、GDF8	9434	70.4	1.48E+08	59.1
化合物17		EGF、FGF、PDGF－A、VEGF、PDGF－D、ムシモール、GDF8	7988	59.6	1.13E+08	45.0
化合物16		EGF、FGF、PDGF－A、VEGF、PDGF－D、ムシモール、GDF8	8303	62.0	9.20E+07	36.7
化合物13		EGF、FGF、PDGF－A、VEGF、PDGF－D、ムシモール、GDF8	7045	52.6	7.22E+07	28.8
化合物19		EGF、FGF、PDGF－A、VEGF、PDGF－D、ムシモール、GDF8	7799	58.2	6.82E+07	27.2
化合物92		EGF、FGF、PDGF－A、VEGF、PDGF－D、ムシモール、GDF8	5886	44.0	5.63E+07	22.5
化合物93		EGF、FGF、PDGF－A、VEGF、PDGF－D、ムシモール、GDF8	5463	40.8	4.38E+07	17.5
化合物94		EGF、FGF、PDGF－A、VEGF、PDGF－D、ムシモール、GDF8	5100	38.1	4.18E+07	16.7
化合物95		EGF、FGF、PDGF－A、VEGF、PDGF－D、ムシモール、GDF8	4510	33.7	3.32E+07	13.3
化合物96		EGF、FGF、PDGF－A、VEGF、PDGF－D、ムシモール、GDF8	4570	34.1	3.09E+07	12.3
化合物97		EGF、FGF、PDGF－A、VEGF、PDGF－D、ムシモール、GDF8	4561	34.1	2.15E+07	8.6
化合物98		EGF、FGF、PDGF－A、VEGF、PDGF－D、ムシモール、GDF8	3176	23.7	9.86E+06	3.9
化合物99		EGF、FGF、PDGF－A、VEGF、PDGF－D、ムシモール、GDF8	1209	9.0	−1.56E+07	−6.2
なし		アクチビンA不含(Wnt3a含有)	15494	98.0	−1.25E+07	−4.4
なし		アクチビンA／Wnt3a	15807	100.0	2.86E+08	100.0
化合物18		EGF、FGF、PDGF－A、VEGF、PDGF－D、ムシモール、GDF8	8742	55.3	1.01E+08	35.4

【０４８０】

【表５－３】

（上記表の続き）

表4						
		処理	細胞数		Sox17発現	
化合物番号			平均総細胞数	陽性対照%	平均総強度	陽性対照%
化合物14		EGF、FGF、PDGF－A、VEGF、PDGF－D、ムシモール、GDF8	8464	53.5	8.33E+07	29.1
化合物15		EGF、FGF、PDGF－A、VEGF、PDGF－D、ムシモール、GDF8	7234	45.8	7.95E+07	27.8
化合物100		EGF、FGF、PDGF－A、VEGF、PDGF－D、ムシモール、GDF8	6805	43.0	5.88E+07	20.6
化合物101		EGF、FGF、PDGF－A、VEGF、PDGF－D、ムシモール、GDF8	5668	35.9	5.34E+07	18.7
化合物102		EGF、FGF、PDGF－A、VEGF、PDGF－D、ムシモール、GDF8	6195	39.2	5.29E+07	18.5
化合物103		EGF、FGF、PDGF－A、VEGF、PDGF－D、ムシモール、GDF8	7545	47.7	5.13E+07	18.0
化合物104		EGF、FGF、PDGF－A、VEGF、PDGF－D、ムシモール、GDF8	4757	30.1	4.58E+07	16.0
化合物105		EGF、FGF、PDGF－A、VEGF、PDGF－D、ムシモール、GDF8	6285	39.8	4.29E+07	15.0
化合物106		EGF、FGF、PDGF－A、VEGF、PDGF－D、ムシモール、GDF8	5622	35.6	2.86E+07	10.0
化合物107		EGF、FGF、PDGF－A、VEGF、PDGF－D、ムシモール、GDF8	3951	25.0	1.72E+07	6.0
化合物108		EGF、FGF、PDGF－A、VEGF、PDGF－D、ムシモール、GDF8	3226	20.4	1.58E+07	5.5
化合物109		EGF、FGF、PDGF－A、VEGF、PDGF－D、ムシモール、GDF8	3473	22.0	1.46E+07	5.1
化合物110		EGF、FGF、PDGF－A、VEGF、PDGF－D、ムシモール、GDF8	3703	23.4	1.32E+07	4.6
化合物111		EGF、FGF、PDGF－A、VEGF、PDGF－D、ムシモール、GDF8	2918	18.5	1.22E+07	4.3
化合物112		EGF、FGF、PDGF－A、VEGF、PDGF－D、ムシモール、GDF8	2975	18.8	1.04E+07	3.6
化合物113		EGF、FGF、PDGF－A、VEGF、PDGF－D、ムシモール、GDF8	2910	18.4	9.18E+06	3.2
化合物114		EGF、FGF、PDGF－A、VEGF、PDGF－D、ムシモール、GDF8	2734	17.3	6.13E+06	2.1
化合物115		EGF、FGF、PDGF－A、VEGF、PDGF－D、ムシモール、GDF8	2169	13.7	3.77E+06	1.3
化合物116		EGF、FGF、PDGF－A、VEGF、PDGF－D、ムシモール、GDF8	3107	19.7	3.52E+06	1.2
化合物117		EGF、FGF、PDGF－A、VEGF、PDGF－D、ムシモール、GDF8	3343	21.1	5.35E+05	0.2
化合物118		EGF、FGF、PDGF－A、VEGF、PDGF－D、ムシモール、GDF8	3034	19.2	2.37E+05	0.1
化合物119		EGF、FGF、PDGF－A、VEGF、PDGF－D、ムシモール、GDF8	2263	14.3	－1.66E+06	－0.6
化合物120		EGF、FGF、PDGF－A、VEGF、PDGF－D、ムシモール、GDF8	1771	11.2	－5.57E+06	－2.0
化合物121		EGF、FGF、PDGF－A、VEGF、PDGF－D、ムシモール、GDF8	1136	7.2	－1.79E+07	－6.3
化合物122		EGF、FGF、PDGF－A、VEGF、PDGF－D、ムシモール、GDF8	2021	12.8	－2.09E+07	－7.3

【０４８１】

【表６－１】

表5						
化合物番号	処理		細胞数		Sox17発現	
			平均総細胞数	陽性対照%	平均総強度	陽性対照%
なし	アクチビンA不含（Wnt3a含有）		7107	67．96	－1．27E＋07	－7．94
なし	アクチビンA／Wnt3a		10459	100．00	1．60E＋08	100．00
化合物17	AA不含（Wnt3a含有）	EGF	6942	73．43	1．27E＋06	0．74
化合物17	AA不含（Wnt3a含有）	EGF＋FGF4	5738	60．69	3．14E＋06	1．83
化合物17	AA不含（Wnt3a含有）	EGF＋FGF4＋PDGF－AB	4453	47．10	9．30E＋05	0．54
化合物17	AA不含（Wnt3a含有）	EGF＋FGF4＋PDGF－AB＋ムシモール	10391	109．91	8．92E＋06	5．20
化合物17	AA不含（Wnt3a含有）	EGF＋PDGF－A＋VEGF	5728	60．59	2．14E＋06	1．24
化合物17	AA不含（Wnt3a含有）	FGF4＋PDGF－A＋VEGF	13198	139．59	1．29E＋07	7．54
化合物17	AA不含（Wnt3a含有）	EGF＋FGF4＋PDGF－A＋VEGF	10480	110．85	8．97E＋06	5．23
化合物17	AA不含（Wnt3a含有）	EGF＋FGF4＋PDGF－A＋ムシモール	13649	144．37	1．45E＋07	8．43
なし	アクチビンA不含（Wnt3a含有）		7107	67．96	－1．27E＋07	－7．94
なし	アクチビンA／Wnt3a		10459	100．00	1．60E＋08	100．00
化合物35	AA不含（Wnt3a含有）	EGF	23887	228．40	－1．01E＋07	－6．32
化合物35	AA不含（Wnt3a含有）	EGF＋FGF4	21268	203．36	1．36E＋06	0．85
化合物35	AA不含（Wnt3a含有）	EGF＋FGF4＋PDGF－AB	17611	168．39	1．28E＋07	8．03
化合物35	AA不含（Wnt3a含有）	EGF＋FGF4＋PDGF－AB＋ムシモール	17949	171．62	1．54E＋06	0．96
化合物35	AA不含（Wnt3a含有）	EGF＋PDGF－A＋VEGF	23242	222．23	1．23E＋07	7．72
化合物35	AA不含（Wnt3a含有）	FGF4＋PDGF－A＋VEGF	16068	153．63	3．92E＋07	24．57
化合物35	AA不含（Wnt3a含有）	EGF＋FGF4＋PDGF－A＋VEGF	16132	154．25	9．11E＋07	57．04
化合物35	AA不含（Wnt3a含有）	EGF＋FGF4＋PDGF－A＋ムシモール	15457	147．80	6．89E＋07	43．15
化合物29	AA不含（Wnt3a含有）	EGF	1971	18．84	－1．44E＋07	－9．00
化合物29	AA不含（Wnt3a含有）	EGF＋FGF4	7436	71．10	－4．35E＋06	－2．72
化合物29	AA不含（Wnt3a含有）	EGF＋FGF4＋PDGF－AB	6535	62．48	－7．52E＋06	－4．71
化合物29	AA不含（Wnt3a含有）	EGF＋FGF4＋PDGF－AB＋ムシモール	1376	13．15	－1．42E＋07	－8．91
化合物29	AA不含（Wnt3a含有）	EGF＋PDGF－A＋VEGF	8880	84．91	－8．53E＋06	－5．34
化合物29	AA不含（Wnt3a含有）	FGF4＋PDGF－A＋VEGF	8146	77．89	－4．82E＋06	－3．02
化合物29	AA不含（Wnt3a含有）	EGF＋FGF4＋PDGF－A＋VEGF	8858	84．70	－7．15E＋06	－4．48
化合物29	AA不含（Wnt3a含有）	EGF＋FGF4＋PDGF－A＋ムシモール	10071	96．30	2．95E＋06	1．85
化合物37	AA不含（Wnt3a含有）	EGF	7966	76．17	－1．19E＋07	－7．42
化合物37	AA不含（Wnt3a含有）	EGF＋FGF4	6932	66．28	－4．62E＋06	－2．89
化合物37	AA不含（Wnt3a含有）	EGF＋FGF4＋PDGF－AB	7473	71．46	－2．61E＋06	－1．63

【０４８２】

【表６－２】

（上記表の続き）

表5						
	処理		細胞数		Sox17発現	
化合物番号			平均総細胞数	陽性対照%	平均総強度	陽性対照%
化合物37	AA不含(Wnt3a含有)	EGF＋FGF4＋PDGF－AB＋ムシモール	7914	75.67	－1.91E＋06	－1.20
化合物37	AA不含(Wnt3a含有)	EGF＋PDGF－A＋VEGF	12956	123.88	－1.25E＋07	－7.82
化合物37	AA不含(Wnt3a含有)	FGF4＋PDGF－A＋VEGF	6731	64.36	－1.10E＋07	－6.89
化合物37	AA不含(Wnt3a含有)	EGF＋FGF4＋PDGF－A＋VEGF	8778	83.93	1.39E＋05	0.09
化合物37	AA不含(Wnt3a含有)	EGF＋FGF4＋PDGF－A＋ムシモール	5821	55.66	－1.22E＋07	－7.64
化合物34	AA不含(Wnt3a含有)	EGF	13062	124.89	2.78E＋07	17.39
化合物34	AA不含(Wnt3a含有)	EGF＋FGF4	13133	125.58	1.23E＋08	76.85
化合物34	AA不含(Wnt3a含有)	EGF＋FGF4＋PDGF－AB	12532	119.83	1.09E＋08	68.41
化合物34	AA不含(Wnt3a含有)	EGF＋FGF4＋PDGF－AB＋ムシモール	15811	151.18	6.90E＋06	4.32
化合物34	AA不含(Wnt3a含有)	EGF＋PDGF－A＋VEGF	11801	112.84	4.04E＋06	2.53
化合物34	AA不含(Wnt3a含有)	FGF4＋PDGF－A＋VEGF	15262	145.93	1.15E＋07	7.18
化合物34	AA不含(Wnt3a含有)	EGF＋FGF4＋PDGF－A＋VEGF	12901	123.36	5.01E＋07	31.35
化合物34	AA不含(Wnt3a含有)	EGF＋FGF4＋PDGF－A＋ムシモール	12208	116.72	5.56E＋07	34.83
なし	アクチビンA不含(Wnt3a含有)		10224	108.14	7.36E＋05	0.43
なし	アクチビンA／Wnt3a		9455	100.00	1.72E＋08	100.00
化合物39	AA不含(Wnt3a含有)	EGF	11615	122.85	1.49E＋05	0.09
化合物39	AA不含(Wnt3a含有)	EGF＋FGF4	10456	110.59	5.11E＋06	2.98
化合物39	AA不含(Wnt3a含有)	EGF＋FGF4＋PDGF－AB	9972	105.47	1.62E＋06	0.94
化合物39	AA不含(Wnt3a含有)	EGF＋FGF4＋PDGF－AB＋ムシモール	10540	111.48	2.22E＋06	1.29
化合物39	AA不含(Wnt3a含有)	EGF＋PDGF－A＋VEGF	17050	180.34	4.84E＋06	2.82
化合物39	AA不含(Wnt3a含有)	FGF4＋PDGF－A＋VEGF	8856	93.67	7.01E＋05	0.41
化合物39	AA不含(Wnt3a含有)	EGF＋FGF4＋PDGF－A＋VEGF	7973	84.33	5.30E＋06	3.09
化合物39	AA不含(Wnt3a含有)	EGF＋FGF4＋PDGF－A＋ムシモール	9103	96.28	7.32E＋05	0.43
化合物22	AA不含(Wnt3a含有)	EGF	14105	149.19	1.75E＋06	1.02
化合物22	AA不含(Wnt3a含有)	EGF＋FGF4	12971	137.19	1.04E＋07	6.05
化合物22	AA不含(Wnt3a含有)	EGF＋FGF4＋PDGF－AB	16580	175.36	8.60E＋06	5.01
化合物22	AA不含(Wnt3a含有)	EGF＋FGF4＋PDGF－AB＋ムシモール	14676	155.23	5.61E＋06	3.27
化合物22	AA不含(Wnt3a含有)	EGF＋PDGF－A＋VEGF	20372	215.48	4.99E＋06	2.91
化合物22	AA不含(Wnt3a含有)	FGF4＋PDGF－A＋VEGF	12277	129.85	4.90E＋06	2.86
化合物22	AA不含(Wnt3a含有)	EGF＋FGF4＋PDGF－A＋VEGF	12522	132.44	7.88E＋06	4.59
化合物22	AA不含(Wnt3a含有)	EGF＋FGF4＋PDGF－A＋ムシモール	11610	122.80	1.33E＋07	7.77

【０４８３】

【表７】

表6						
	処理		細胞数		Sox17発現	
化合物番号			平均総細胞数	陽性対照%	平均総強度	陽性対照%
なし	アクチビンA不含(Wnt3a含有)		477	6.64	7.4E＋04	0.09
なし	アクチビンA／Wnt3a		7185	100.00	8.0E＋07	100.00
化合物34	AA不含(Wnt3a含有)	なし	4611	64.18	1.4E＋07	17.21
化合物34	AA不含(Wnt3a含有)	EGF	6145	85.53	1.5E＋07	19.18
化合物34	AA不含(Wnt3a含有)	FGF4	5323	74.09	2.7E＋07	33.75
化合物34	AA不含(Wnt3a含有)	PDGF－D	5017	69.84	1.5E＋07	18.76
化合物34	AA不含(Wnt3a含有)	PDGF－A	4175	58.11	1.1E＋07	13.43
化合物34	AA不含(Wnt3a含有)	VEGF	4713	65.60	1.0E＋07	12.49
化合物34	AA不含(Wnt3a含有)	GDF8	6354	88.44	7.1E＋07	88.59
化合物34	AA不含(Wnt3a含有)	ムシモール	7286	101.41	3.1E＋07	38.38
化合物34	AA不含(Wnt3a含有)	PDGF－D＋VEGF	5030	70.01	1.2E＋07	14.58
化合物34	AA不含(Wnt3a含有)	VEGF＋ムシモール	776	10.81	1.3E＋06	1.56
化合物34	AA不含(Wnt3a含有)	PDGF－D＋ムシモール	3490	48.57	6.5E＋06	8.02
化合物34	AA不含(Wnt3a含有)	GDF8＋PDGF－D	6889	95.88	5.8E＋07	72.59
化合物34	AA不含(Wnt3a含有)	PDGF－D＋ムシモール＋VEGF	2133	29.68	2.7E＋06	3.32
化合物34	AA不含(Wnt3a含有)	GDF8＋PDGF－D＋VEGF	5585	77.74	6.6E＋07	81.75
化合物34	AA不含(Wnt3a含有)	GDF8＋VEGF＋ムシモール	6083	84.67	5.6E＋07	69.62
化合物34	AA不含(Wnt3a含有)	GDF8＋PDGF－D＋VEGF＋ムシモール	9455	131.60	9.6E＋07	119.24
化合物34	AA不含(Wnt3a含有)	EGF＋FGF4＋PDGF－A＋VEGF＋PDGF－D＋ムシモール＋GDF8	4757	66.21	3.9E＋07	48.77
化合物34	AA不含(Wnt3a含有)	EGF＋FGF4＋PDGF－A＋VEGF＋PDGF－D＋ムシモール＋GDF8	6028	83.90	7.0E＋07	87.44

【０４８４】

【表８－１】

表7						
			細胞数		Sox17発現	
プレート	処理	化合物番号	平均総細胞数	陽性対照%	平均総強度	陽性対照%
1	アクチビンA不含(Wnt3a含有)	なし	6049	45.2	－1.31E+07	－5.2
1	アクチビンA／Wnt3a	なし	13392	100.0	2.50E+08	100.0
1	EGF、FGF、PDGF－A、VEGF、PDGF－D、ムシモール、GDF8	化合物18	13037	97.3	1.63E+08	65.2
1	EGF、FGF、PDGF－A、VEGF、PDGF－D、ムシモール、GDF8	化合物14	9344	69.8	1.23E+08	49.0
1	EGF、FGF、PDGF－A、VEGF、PDGF－D、ムシモール、GDF8	化合物15	8448	63.1	8.64E+07	34.5
1	EGF、FGF、PDGF－A、VEGF、PDGF－D、ムシモール、GDF8	化合物16	5498	41.1	6.56E+07	26.2
1	EGF、FGF、PDGF－A、VEGF、PDGF－D、ムシモール、GDF8	化合物64	5063	37.8	5.88E+07	23.5
1	EGF、FGF、PDGF－A、VEGF、PDGF－D、ムシモール、GDF8	化合物65	4788	35.8	4.57E+07	18.2
1	EGF、FGF、PDGF－A、VEGF、PDGF－D、ムシモール、GDF8	化合物66	8129	60.7	3.53E+07	14.1
1	EGF、FGF、PDGF－A、VEGF、PDGF－D、ムシモール、GDF8	化合物67	6791	50.7	3.18E+07	12.7
1	EGF、FGF、PDGF－A、VEGF、PDGF－D、ムシモール、GDF8	化合物68	3456	25.8	2.30E+07	9.2
1	EGF、FGF、PDGF－A、VEGF、PDGF－D、ムシモール、GDF8	化合物69	3995	29.8	1.69E+07	6.8
1	EGF、FGF、PDGF－A、VEGF、PDGF－D、ムシモール、GDF8	化合物70	474	3.5	－1.80E+07	－7.2
2	アクチビンA不含(Wnt3a含有)	なし	15494	98.0	－1.25E+07	－4.4
2	アクチビンA／Wnt3a	なし	15807	100.0	2.86E+08	100.0
2	EGF、FGF、PDGF－A、VEGF、PDGF－D、ムシモール、GDF8	化合物19	8425	53.3	1.19E+08	41.6
2	EGF、FGF、PDGF－A、VEGF、PDGF－D、ムシモール、GDF8	化合物13	9123	57.7	1.13E+08	39.7
2	EGF、FGF、PDGF－A、VEGF、PDGF－D、ムシモール、GDF8	化合物71	6048	38.3	5.51E+07	19.3
2	EGF、FGF、PDGF－A、VEGF、PDGF－D、ムシモール、GDF8	化合物72	6060	38.3	5.46E+07	19.1
2	EGF、FGF、PDGF－A、VEGF、PDGF－D、ムシモール、GDF8	化合物73	5545	35.1	3.99E+07	14.0
2	EGF、FGF、PDGF－A、VEGF、PDGF－D、ムシモール、GDF8	化合物74	10898	68.9	3.91E+07	13.7
2	EGF、FGF、PDGF－A、VEGF、PDGF－D、ムシモール、GDF8	化合物75	4117	26.0	3.01E+07	10.5
2	EGF、FGF、PDGF－A、VEGF、PDGF－D、ムシモール、GDF8	化合物76	3825	24.2	2.74E+07	9.6
2	EGF、FGF、PDGF－A、VEGF、PDGF－D、ムシモール、GDF8	化合物77	5928	37.5	2.44E+07	8.5
2	EGF、FGF、PDGF－A、VEGF、PDGF－D、ムシモール、GDF8	化合物78	3303	20.9	2.03E+07	7.1
2	EGF、FGF、PDGF－A、VEGF、PDGF－D、ムシモール、GDF8	化合物79	4767	30.2	1.85E+07	6.5
2	EGF、FGF、PDGF－A、VEGF、PDGF－D、ムシモール、GDF8	化合物80	2194	13.9	1.22E+07	4.3
2	EGF、FGF、PDGF－A、VEGF、PDGF－D、ムシモール、GDF8	化合物81	2920	18.5	9.16E+05	0.3
2	EGF、FGF、PDGF－A、VEGF、PDGF－D、ムシモール、GDF8	化合物82	1819	11.5	－1.05E+07	－3.7
2	EGF、FGF、PDGF－A、VEGF、PDGF－D、ムシモール、GDF8	化合物83	2153	13.6	－1.19E+07	－4.2
2	EGF、FGF、PDGF－A、VEGF、PDGF－D、ムシモール、GDF8	化合物84	58	0.4	－2.94E+07	－10.3
2	EGF、FGF、PDGF－A、VEGF、PDGF－D、ムシモール、GDF8	化合物85	57	0.4	－3.03E+07	－10.6
1	アクチビンA不含(Wnt3a含有)	なし	6049	45.2	－1.31E+07	－5.2

【０４８５】

【表８－２】

（上記表の続き）

表7						
			細胞数		Sox17発現	
プレート	処理	化合物番号	平均総細胞数	陽性対照%	平均総強度	陽性対照%
1	アクチビンA／Wnt3a	なし	13392	100.0	2.50E+08	100.0
1	EGF、FGF、PDGF－A、VEGF、PDGF－D、ムシモール、GDF8	化合物20	9434	70.4	1.48E+08	59.1
1	EGF、FGF、PDGF－A、VEGF、PDGF－D、ムシモール、GDF8	化合物17	7988	59.6	1.13E+08	45.0
1	EGF、FGF、PDGF－A、VEGF、PDGF－D、ムシモール、GDF8	化合物16	8303	62.0	9.20E+07	36.7
1	EGF、FGF、PDGF－A、VEGF、PDGF－D、ムシモール、GDF8	化合物13	7045	52.6	7.22E+07	28.8
1	EGF、FGF、PDGF－A、VEGF、PDGF－D、ムシモール、GDF8	化合物19	7799	58.2	6.82E+07	27.2
1	EGF、FGF、PDGF－A、VEGF、PDGF－D、ムシモール、GDF8	化合物92	5886	44.0	5.63E+07	22.5
1	EGF、FGF、PDGF－A、VEGF、PDGF－D、ムシモール、GDF8	化合物93	5463	40.8	4.38E+07	17.5
1	EGF、FGF、PDGF－A、VEGF、PDGF－D、ムシモール、GDF8	化合物94	5100	38.1	4.18E+07	16.7
1	EGF、FGF、PDGF－A、VEGF、PDGF－D、ムシモール、GDF8	化合物95	4510	33.7	3.32E+07	13.3
1	EGF、FGF、PDGF－A、VEGF、PDGF－D、ムシモール、GDF8	化合物96	4570	34.1	3.09E+07	12.3
1	EGF、FGF、PDGF－A、VEGF、PDGF－D、ムシモール、GDF8	化合物97	4561	34.1	2.15E+07	8.6
1	EGF、FGF、PDGF－A、VEGF、PDGF－D、ムシモール、GDF8	化合物98	3176	23.7	9.86E+06	3.9
1	EGF、FGF、PDGF－A、VEGF、PDGF－D、ムシモール、GDF8	化合物99	1209	9.0	－1.56E+07	－6.2
2	アクチビンA不含（Wnt3a含有）	なし	15494	98.0	－1.25E+07	－4.4
2	アクチビンA／Wnt3a	なし	15807	100.0	2.86E+08	100.0
2	EGF、FGF、PDGF－A、VEGF、PDGF－D、ムシモール、GDF8	化合物18	8742	55.3	1.01E+08	35.4
2	EGF、FGF、PDGF－A、VEGF、PDGF－D、ムシモール、GDF8	化合物14	8464	53.5	8.33E+07	29.1
2	EGF、FGF、PDGF－A、VEGF、PDGF－D、ムシモール、GDF8	化合物15	7234	45.8	7.95E+07	27.8
2	EGF、FGF、PDGF－A、VEGF、PDGF－D、ムシモール、GDF8	化合物100	6805	43.0	5.88E+07	20.6
2	EGF、FGF、PDGF－A、VEGF、PDGF－D、ムシモール、GDF8	化合物101	5668	35.9	5.34E+07	18.7
2	EGF、FGF、PDGF－A、VEGF、PDGF－D、ムシモール、GDF8	化合物102	6195	39.2	5.29E+07	18.5
2	EGF、FGF、PDGF－A、VEGF、PDGF－D、ムシモール、GDF8	化合物103	7545	47.7	5.13E+07	18.0
2	EGF、FGF、PDGF－A、VEGF、PDGF－D、ムシモール、GDF8	化合物104	4757	30.1	4.58E+07	16.0
2	EGF、FGF、PDGF－A、VEGF、PDGF－D、ムシモール、GDF8	化合物105	6285	39.8	4.29E+07	15.0
2	EGF、FGF、PDGF－A、VEGF、PDGF－D、ムシモール、GDF8	化合物106	5622	35.6	2.86E+07	10.0
2	EGF、FGF、PDGF－A、VEGF、PDGF－D、ムシモール、GDF8	化合物107	3951	25.0	1.72E+07	6.0
2	EGF、FGF、PDGF－A、VEGF、PDGF－D、ムシモール、GDF8	化合物108	3226	20.4	1.58E+07	5.5
2	EGF、FGF、PDGF－A、VEGF、PDGF－D、ムシモール、GDF8	化合物109	3473	22.0	1.46E+07	5.1
2	EGF、FGF、PDGF－A、VEGF、PDGF－D、ムシモール、GDF8	化合物110	3703	23.4	1.32E+07	4.6
2	EGF、FGF、PDGF－A、VEGF、PDGF－D、ムシモール、GDF8	化合物111	2918	18.5	1.22E+07	4.3
2	EGF、FGF、PDGF－A、VEGF、PDGF－D、ムシモール、GDF8	化合物112	2975	18.8	1.04E+07	3.6
2	EGF、FGF、PDGF－A、VEGF、PDGF－D、ムシモール、GDF8	化合物113	2910	18.4	9.18E+06	3.2

【０４８６】

【表８－３】

（上記表の続き）

表7						
			細胞数		Sox17発現	
プレート	処理	化合物番号	平均総細胞数	陽性対照%	平均総強度	陽性対照%
2	EGF、FGF、PDGF－A、VEGF、PDGF－D、ムシモール、GDF8	化合物114	2734	17．3	6．13E＋06	2．1
2	EGF、FGF、PDGF－A、VEGF、PDGF－D、ムシモール、GDF8	化合物115	2169	13．7	3．77E＋06	1．3
2	EGF、FGF、PDGF－A、VEGF、PDGF－D、ムシモール、GDF8	化合物116	3107	19．7	3．52E＋06	1．2
2	EGF、FGF、PDGF－A、VEGF、PDGF－D、ムシモール、GDF8	化合物117	3343	21．1	5．35E＋05	0．2
2	EGF、FGF、PDGF－A、VEGF、PDGF－D、ムシモール、GDF8	化合物118	3034	19．2	2．37E＋05	0．1
2	EGF、FGF、PDGF－A、VEGF、PDGF－D、ムシモール、GDF8	化合物119	2263	14．3	－1．66E＋06	－0．6
2	EGF、FGF、PDGF－A、VEGF、PDGF－D、ムシモール、GDF8	化合物120	1771	11．2	－5．57E＋06	－2．0
2	EGF、FGF、PDGF－A、VEGF、PDGF－D、ムシモール、GDF8	化合物121	1136	7．2	－1．79E＋07	－6．3
2	EGF、FGF、PDGF－A、VEGF、PDGF－D、ムシモール、GDF8	化合物122	2021	12．8	－2．09E＋07	－7．3
1	アクチビンA不含（Wnt3a含有）	なし	6049	45．2	－1．31E＋07	－5．2
1	アクチビンA／Wnt3a	なし	13392	100．0	2．50E＋08	100．0
1	EGF、FGF、PDGF－A、VEGF、PDGF－D、ムシモール、GDF8	化合物19	15878	118．6	2．67E＋08	106．5
1	EGF、FGF、PDGF－A、VEGF、PDGF－D、ムシモール、GDF8	化合物24	12714	94．9	2．46E＋08	98．2
1	EGF、FGF、PDGF－A、VEGF、PDGF－D、ムシモール、GDF8	化合物23	12165	90．8	2．15E＋08	86．0
1	EGF、FGF、PDGF－A、VEGF、PDGF－D、ムシモール、GDF8	化合物21	12640	94．4	1．65E＋08	65．9
1	EGF、FGF、PDGF－A、VEGF、PDGF－D、ムシモール、GDF8	化合物13	11491	85．8	1．61E＋08	64．3
1	EGF、FGF、PDGF－A、VEGF、PDGF－D、ムシモール、GDF8	化合物30	11396	85．1	1．34E＋08	53．4
1	EGF、FGF、PDGF－A、VEGF、PDGF－D、ムシモール、GDF8	化合物36	7964	59．5	9．47E＋07	37．8
1	EGF、FGF、PDGF－A、VEGF、PDGF－D、ムシモール、GDF8	化合物32	8066	60．2	9．29E＋07	37．1
1	EGF、FGF、PDGF－A、VEGF、PDGF－D、ムシモール、GDF8	化合物26	7415	55．4	8．30E＋07	33．1
1	EGF、FGF、PDGF－A、VEGF、PDGF－D、ムシモール、GDF8	化合物17	6994	52．2	7．76E＋07	31．0
1	EGF、FGF、PDGF－A、VEGF、PDGF－D、ムシモール、GDF8	化合物31	6957	51．9	6．59E＋07	26．3
1	EGF、FGF、PDGF－A、VEGF、PDGF－D、ムシモール、GDF8	化合物179	3573	26．7	2．43E＋07	9．7
1	EGF、FGF、PDGF－A、VEGF、PDGF－D、ムシモール、GDF8	化合物180	922	6．9	－2．20E＋07	－8．8
1	EGF、FGF、PDGF－A、VEGF、PDGF－D、ムシモール、GDF8	化合物181	8	0．1	－2．68E＋07	－10．7
2	アクチビンA不含（Wnt3a含有）	なし	15494	98．0	－1．25E＋07	－4．4
2	アクチビンA／Wnt3a	なし	15807	100．0	2．86E＋08	100．0
2	EGF、FGF、PDGF－A、VEGF、PDGF－D、ムシモール、GDF8	化合物18	21102	133．5	4．18E＋08	146．3
2	EGF、FGF、PDGF－A、VEGF、PDGF－D、ムシモール、GDF8	化合物15	15373	97．3	3．74E＋08	130．8
2	EGF、FGF、PDGF－A、VEGF、PDGF－D、ムシモール、GDF8	化合物14	9008	57．0	2．62E＋08	91．6
2	EGF、FGF、PDGF－A、VEGF、PDGF－D、ムシモール、GDF8	化合物38	9650	61．0	2．46E＋08	86．2
2	EGF、FGF、PDGF－A、VEGF、PDGF－D、ムシモール、GDF8	化合物35	10461	66．2	1．59E＋08	55．7

【０４８７】

【表８－４】

（上記表の続き）

表7						
			細胞数		Sox17発現	
プレート	処理	化合物番号	平均総細胞数	陽性対照%	平均総強度	陽性対照%
2	EGF、FGF、PDGF－A、VEGF、PDGF－D、ムシモール、GDF8	化合物16	9064	57.3	1.48E+08	51.8
2	EGF、FGF、PDGF－A、VEGF、PDGF－D、ムシモール、GDF8	化合物34	8907	56.3	9.99E+07	35.0
2	EGF、FGF、PDGF－A、VEGF、PDGF－D、ムシモール、GDF8	化合物20	7346	46.5	8.90E+07	31.2
2	EGF、FGF、PDGF－A、VEGF、PDGF－D、ムシモール、GDF8	化合物27	8044	50.9	8.81E+07	30.8
2	EGF、FGF、PDGF－A、VEGF、PDGF－D、ムシモール、GDF8	化合物28	7591	48.0	8.77E+07	30.7
2	EGF、FGF、PDGF－A、VEGF、PDGF－D、ムシモール、GDF8	化合物40	4049	25.6	8.23E+07	28.8
2	EGF、FGF、PDGF－A、VEGF、PDGF－D、ムシモール、GDF8	化合物33	7485	47.4	8.10E+07	28.3
2	EGF、FGF、PDGF－A、VEGF、PDGF－D、ムシモール、GDF8	化合物25	6571	41.6	7.60E+07	26.6
2	EGF、FGF、PDGF－A、VEGF、PDGF－D、ムシモール、GDF8	化合物182	7631	48.3	6.74E+07	23.6
2	EGF、FGF、PDGF－A、VEGF、PDGF－D、ムシモール、GDF8	化合物183	6777	42.9	5.93E+07	20.8
2	EGF、FGF、PDGF－A、VEGF、PDGF－D、ムシモール、GDF8	化合物184	5475	34.6	5.44E+07	19.0
2	EGF、FGF、PDGF－A、VEGF、PDGF－D、ムシモール、GDF8	化合物185	4093	25.9	4.92E+07	17.2
2	EGF、FGF、PDGF－A、VEGF、PDGF－D、ムシモール、GDF8	化合物186	5274	33.4	4.63E+07	16.2
2	EGF、FGF、PDGF－A、VEGF、PDGF－D、ムシモール、GDF8	化合物187	5342	33.8	4.02E+07	14.1
2	EGF、FGF、PDGF－A、VEGF、PDGF－D、ムシモール、GDF8	化合物188	5533	35.0	3.98E+07	13.9
2	EGF、FGF、PDGF－A、VEGF、PDGF－D、ムシモール、GDF8	化合物189	5928	37.5	3.96E+07	13.9
2	EGF、FGF、PDGF－A、VEGF、PDGF－D、ムシモール、GDF8	化合物190	4822	30.5	3.90E+07	13.7
2	EGF、FGF、PDGF－A、VEGF、PDGF－D、ムシモール、GDF8	化合物191	4249	26.9	3.81E+07	13.3
2	EGF、FGF、PDGF－A、VEGF、PDGF－D、ムシモール、GDF8	化合物192	5616	35.5	3.54E+07	12.4
2	EGF、FGF、PDGF－A、VEGF、PDGF－D、ムシモール、GDF8	化合物193	4158	26.3	3.23E+07	11.3
2	EGF、FGF、PDGF－A、VEGF、PDGF－D、ムシモール、GDF8	化合物194	3470	22.0	2.96E+07	10.4
2	EGF、FGF、PDGF－A、VEGF、PDGF－D、ムシモール、GDF8	化合物195	3800	24.0	2.95E+07	10.3
2	EGF、FGF、PDGF－A、VEGF、PDGF－D、ムシモール、GDF8	化合物196	4619	29.2	2.78E+07	9.7
2	EGF、FGF、PDGF－A、VEGF、PDGF－D、ムシモール、GDF8	化合物197	4011	25.4	2.45E+07	8.6
2	EGF、FGF、PDGF－A、VEGF、PDGF－D、ムシモール、GDF8	化合物198	4367	27.6	1.92E+07	6.7
2	EGF、FGF、PDGF－A、VEGF、PDGF－D、ムシモール、GDF8	化合物199	3162	20.0	1.20E+07	4.2
2	EGF、FGF、PDGF－A、VEGF、PDGF－D、ムシモール、GDF8	化合物200	2087	13.2	4.43E+06	1.6
2	EGF、FGF、PDGF－A、VEGF、PDGF－D、ムシモール、GDF8	化合物201	1568	9.9	－6.17E+06	－2.2
2	EGF、FGF、PDGF－A、VEGF、PDGF－D、ムシモール、GDF8	化合物202	5213	33.0	－1.41E+07	－4.9
2	EGF、FGF、PDGF－A、VEGF、PDGF－D、ムシモール、GDF8	化合物203	7	0.0	－3.04E+07	－10.6
2	EGF、FGF、PDGF－A、VEGF、PDGF－D、ムシモール、GDF8	化合物204	11	0.1	－3.18E+07	－11.1
2	EGF、FGF、PDGF－A、VEGF、PDGF－D、ムシモール、GDF8	化合物205	10	0.1	－3.20E+07	－11.2

【０４８８】

【表９】

表8				
	細胞数		Sox17発現	
化合物番号	平均総細胞数	陽性対照%	平均総強度	陽性対照%
化合物18	21102	133.5	4.18E+08	146.3
化合物15	15373	97.3	3.74E+08	130.8
化合物19	15878	118.6	2.67E+08	106.5
化合物24	12714	94.9	2.46E+08	98.2
化合物14	9008	57.0	2.62E+08	91.6
化合物38	9650	61.0	2.46E+08	86.2
化合物23	12165	90.8	2.15E+08	86.0
化合物21	12640	94.4	1.65E+08	65.9
化合物13	11491	85.8	1.61E+08	64.3
化合物35	10461	66.2	1.59E+08	55.7
化合物30	11396	85.1	1.34E+08	53.4
化合物16	9064	57.3	1.48E+08	51.8
化合物36	7964	59.5	9.47E+07	37.8
化合物32	8066	60.2	9.29E+07	37.1
化合物34	8907	56.3	9.99E+07	35.0
化合物26	7415	55.4	8.30E+07	33.1
化合物20	7346	46.5	8.90E+07	31.2
化合物17	6994	52.2	7.76E+07	31.0
化合物27	8044	50.9	8.81E+07	30.8
化合物28	7591	48.0	8.77E+07	30.7
化合物40	4049	25.6	8.23E+07	28.8
化合物33	7485	47.4	8.10E+07	28.3
化合物25	6571	41.6	7.60E+07	26.6
化合物31	6957	51.9	6.59E+07	26.3
化合物20	9434	70.4	1.48E+08	59.1
化合物17	7988	59.6	1.13E+08	45.0
化合物16	8303	62.0	9.20E+07	36.7
化合物18	8742	55.3	1.01E+08	35.4
化合物14	8464	53.5	8.33E+07	29.1
化合物13	7045	52.6	7.22E+07	28.8
化合物15	7234	45.8	7.95E+07	27.8
化合物19	7799	58.2	6.82E+07	27.2

【０４８９】

【表１０－１】

表9							
	処理			細胞数		Sox17発現	
プレート番号	アクチビンA	化合物番号	増殖因子	平均総細胞数	陽性対照%	平均総強度	陽性対照%
1	なし	なし	なし	9164	149.46	−5.91E+06	−5.17
1	10ng／mLのAA	なし	なし	6132	100.00	1.52E+06	1.33
1	100ng／mLのAA	なし	なし	9658	157.51	1.14E+08	100.00
1	10ng／mLのAA	化合物22	EGF+FGF4+PDGF−A+VEGF+PDGF−D+ムシモール+GDF8+Wnt3a	8556	139.53	8.78E+07	76.82
1	10ng／mLのAA	化合物22	EGF+FGF4+PDGF−AB+VEGF+Wnt3a	7657	124.87	4.70E+07	41.09
1	10ng／mLのAA	化合物22	EGF+FGF4+PDGF−A+ムシモール+Wnt3a	8100	132.10	4.42E+07	38.65
1	10ng／mLのAA	化合物22	EGF+FGF4+PDGF−AB+Wnt3a	7975	130.06	3.43E+07	30.03
1	10ng／mLのAA	化合物22	EGF+FGF4+Wnt3a	9800	159.83	4.59E+07	40.13
1	10ng／mLのAA	化合物22	FGF4+Wnt3a	6490	105.84	4.28E+07	37.43
1	10ng／mLのAA	化合物22	EGF+Wnt3a	5001	81.55	2.80E+07	24.45
1	10ng／mLのAA	化合物22	Wnt3a	4543	74.09	3.05E+07	26.65
1	10ng／mLのAA	化合物35	EGF+FGF4+PDGF−A+VEGF+PDGF−D+ムシモール+GDF8+Wnt3a	2522	41.14	−4.86E+06	−4.25
1	10ng／mLのAA	化合物35	EGF+FGF4+PDGF−AB+VEGF+Wnt3a	3479	56.74	−3.96E+06	−3.46
1	10ng／mLのAA	化合物35	EGF+FGF4+PDGF−A+ムシモール+Wnt3a	3820	62.29	−1.67E+06	−1.46
1	10ng／mLのAA	化合物35	EGF+FGF4+PDGF−AB+Wnt3a	3263	53.21	−4.56E+06	−3.99
1	10ng／mLのAA	化合物35	EGF+FGF4+Wnt3a	2704	44.10	−4.17E+06	−3.65
1	10ng／mLのAA	化合物35	FGF4+Wnt3a	284	4.64	−7.54E+06	−6.59
1	10ng／mLのAA	化合物35	EGF+Wnt3a	155	2.53	−7.82E+06	−6.84
1	10ng／mLのAA	化合物35	Wnt3a	173	2.83	−7.61E+06	−6.66
1	10ng／mLのAA	化合物29	EGF+FGF4+PDGF−A+VEGF+PDGF−D+ムシモール+GDF8+Wnt3a	2737	44.63	2.41E+07	21.10
1	10ng／mLのAA	化合物29	EGF+FGF4+PDGF−AB+VEGF+Wnt3a	2283	37.23	5.59E+06	4.88
1	10ng／mLのAA	化合物29	EGF+FGF4+PDGF−A+ムシモール+Wnt3a	4676	76.26	2.41E+07	21.11
1	10ng／mLのAA	化合物29	EGF+FGF4+PDGF−AB+Wnt3a	3964	64.65	2.27E+07	19.89
1	10ng／mLのAA	化合物29	EGF+FGF4+Wnt3a	1736	28.31	1.98E+06	1.73
1	10ng／mLのAA	化合物29	FGF4+Wnt3a	2139	34.89	6.98E+06	6.10
1	10ng／mLのAA	化合物29	EGF+Wnt3a	365	5.96	−4.86E+06	−4.25
1	10ng／mLのAA	化合物29	Wnt3a	2090	34.09	4.89E+06	4.28
2	なし	なし	なし	9325	121.89	−3.35E+06	−3.01

【０４９０】

【表１０－２】

（上記表の続き）

表9							
	処理			細胞数		Sox17発現	
プレート番号	アクチビンA	化合物番号	増殖因子	平均総細胞数	陽性対照%	平均総強度	陽性対照%
2	10ng／mLのAA	なし	なし	5177	67．67	3．89E＋06	3．49
2	100ng／mLのAA	なし	なし	7650	100．00	1．11E＋08	100．00
2	10ng／mLのAA	化合物34	EGF＋FGF4＋PDGF－A＋VEGF＋PDGF－D＋ムシモール＋GDF8＋Wnt3a	18362	240．02	3．45E＋08	309．74
2	10ng／mLのAA	化合物34	EGF＋FGF4＋PDGF－AB＋VEGF＋Wnt3a	15574	203．58	2．59E＋08	232．70
2	10ng／mLのAA	化合物34	EGF＋FGF4＋PDGF－A＋ムシモール＋Wnt3a	17890	233．85	2．88E＋08	258．30
2	10ng／mLのAA	化合物34	EGF＋FGF4＋PDGF－AB＋Wnt3a	17875	233．65	2．68E＋08	241．07
2	10ng／mLのAA	化合物34	EGF＋FGF4＋Wnt3a	14158	185．07	2．40E＋08	215．35
2	10ng／mLのAA	化合物34	FGF4＋Wnt3a	13323	174．15	2．19E＋08	196．86
2	10ng／mLのAA	化合物34	EGF＋Wnt3a	14527	189．89	2．28E＋08	204．84
2	10ng／mLのAA	化合物34	Wnt3a	3589	46．91	7．02E＋07	63．08
2	10ng／mLのAA	化合物39	EGF＋FGF4＋PDGF－A＋VEGF＋PDGF－D＋ムシモール＋GDF8＋Wnt3a	5738	75．00	2．14E＋07	19．24
2	10ng／mLのAA	化合物39	EGF＋FGF4＋PDGF－AB＋VEGF＋Wnt3a	2531	33．08	2．82E＋06	2．53
2	10ng／mLのAA	化合物39	EGF＋FGF4＋PDGF－A＋ムシモール＋Wnt3a	2879	37．64	3．61E＋06	3．24
2	10ng／mLのAA	化合物39	EGF＋FGF4＋PDGF－AB＋Wnt3a	2989	39．07	－1．78E＋04	－0．02
2	10ng／mLのAA	化合物39	EGF＋FGF4＋Wnt3a	734	9．59	－3．93E＋06	－3．53
2	10ng／mLのAA	化合物39	FGF4＋Wnt3a	521	6．81	－4．46E＋06	－4．01
2	10ng／mLのAA	化合物39	EGF＋Wnt3a	211	2．75	－4．54E＋06	－4．08
2	10ng／mLのAA	化合物39	Wnt3a	518	6．78	－2．37E＋06	－2．13
2	10ng／mLのAA	化合物37	EGF＋FGF4＋PDGF－A＋VEGF＋PDGF－D＋ムシモール＋GDF8＋Wnt3a	5711	74．65	1．21E＋07	10．82
2	10ng／mLのAA	化合物37	EGF＋FGF4＋PDGF－AB＋VEGF＋Wnt3a	4767	62．31	－5．16E＋05	－0．46
2	10ng／mLのAA	化合物37	EGF＋FGF4＋PDGF－A＋ムシモール＋Wnt3a	4540	59．34	9．23E＋05	0．83
2	10ng／mLのAA	化合物37	EGF＋FGF4＋PDGF－AB＋Wnt3a	4223	55．20	－6．15E＋05	－0．55
2	10ng／mLのAA	化合物37	EGF＋FGF4＋Wnt3a	3501	45．77	5．60E＋05	0．50
2	10ng／mLのAA	化合物37	FGF4＋Wnt3a	3930	51．37	－1．88E＋06	－1．69
2	10ng／mLのAA	化合物37	EGF＋Wnt3a	1431	18．70	－2．75E＋06	－2．47
2	10ng／mLのAA	化合物37	Wnt3a	791	10．34	－2．99E＋06	－2．68

【０４９１】

【表１１】

表10							
化合物番号	処理			細胞数		Sox17発現	
				平均総細胞数	陽性対照%	平均総強度	陽性対照%
なし	アクチビンA不含(Wnt3a含有)			4273	33.70	4.75E+07	17.49
なし	アクチビンA含有(Wnt3a含有)			12676	100.00	2.72E+08	100.00
化合物34	AA不含(Wnt3a含有)	FGF(50ng／mL)	EGF(50ng／mL)	13317	105.06	2.01E+08	74.08
化合物34	AA不含(Wnt3a含有)	FGF(50ng／mL)	EGF(100ng／mL)	14189	111.93	2.01E+08	73.90
化合物34	AA不含(Wnt3a含有)	FGF(100ng／mL)	EGF(50ng／mL)	12616	99.52	1.80E+08	66.21
化合物34	AA不含(Wnt3a含有)	FGF(100ng／mL)	EGF(100ng／mL)	8269	65.23	1.13E+08	41.73
化合物34	AA不含(Wnt3a含有)	なし	なし	11711	92.38	1.65E+08	60.68
化合物34	AA不含(Wnt3a含有)	なし	EGF(25ng／mL)	16052	126.63	2.14E+08	78.82
化合物34	AA不含(Wnt3a含有)	なし	EGF(50ng／mL)	13593	107.23	1.94E+08	71.52
化合物34	AA不含(Wnt3a含有)	なし	EGF(100ng／mL)	13170	103.90	1.93E+08	71.04
化合物34	AA不含(Wnt3a含有)	FGF(25ng／mL)	なし	18433	145.41	2.49E+08	91.72
化合物34	AA不含(Wnt3a含有)	FGF(25ng／mL)	EGF(25ng／mL)	18841	148.63	2.60E+08	95.72
化合物34	AA不含(Wnt3a含有)	FGF(25ng／mL)	EGF(50ng／mL)	16232	128.05	2.30E+08	84.79
化合物34	AA不含(Wnt3a含有)	FGF(25ng／mL)	EGF(100ng／mL)	9309	73.44	1.39E+08	51.00
化合物34	AA不含(Wnt3a含有)	FGF(50ng／mL)	なし	12757	100.64	1.66E+08	61.10
化合物34	AA不含(Wnt3a含有)	FGF(50ng／mL)	EGF(25ng／mL)	17720	139.79	2.31E+08	85.01
化合物34	AA不含(Wnt3a含有)	FGF(50ng／mL)	EGF(50ng／mL)	16331	128.83	2.26E+08	83.11
化合物34	AA不含(Wnt3a含有)	FGF(50ng／mL)	EGF(100ng／mL)	16336	128.87	2.32E+08	85.24
化合物34	AA不含(Wnt3a含有)	FGF(100ng／mL)	なし	19853	156.61	2.59E+08	95.45
化合物34	AA不含(Wnt3a含有)	FGF(100ng／mL)	EGF(25ng／mL)	19880	156.83	2.59E+08	95.47
化合物34	AA不含(Wnt3a含有)	FGF(100ng／mL)	EGF(50ng／mL)	18166	143.30	2.35E+08	86.30
化合物34	AA不含(Wnt3a含有)	FGF(100ng／mL)	EGF(100ng／mL)	11241	88.68	1.55E+08	57.10
なし	AA不含(Wnt3a含有)	なし	EGF(50ng／mL)	5558	43.85	5.01E+07	18.44
なし	AA不含(Wnt3a含有)	なし	EGF(100ng／mL)	6818	53.79	6.42E+07	23.62
なし	AA不含(Wnt3a含有)	FGF(50ng／mL)	なし	8494	67.01	6.62E+07	24.35
なし	AA不含(Wnt3a含有)	FGF(50ng／mL)	EGF(50ng／mL)	10138	79.98	7.30E+07	26.87
なし	AA不含(Wnt3a含有)	FGF(50ng／mL)	EGF(100ng／mL)	10219	80.62	7.75E+07	28.51
なし	AA不含(Wnt3a含有)	FGF(100ng／mL)	なし	9944	78.45	6.68E+07	24.59
なし	AA不含(Wnt3a含有)	FGF(100ng／mL)	EGF(50ng／mL)	11046	87.14	8.17E+07	30.07
なし	AA不含(Wnt3a含有)	FGF(100ng／mL)	EGF(100ng／mL)	7695	60.71	6.87E+07	25.28

【０４９２】

【表１２】

表11				
	正規化SOX17強度			
	アクチビンA		GDF8	
ng／mL	平均	SD	平均	SD
1600	100.00	9.20	100.00	9.00
800	100.00	6.60	84.90	6.30
400	100.00	3.30	72.20	7.50
200	100.00	1.90	51.30	5.30
100	90.70	8.70	32.70	5.10
50	85.20	4.70	17.60	4.80
25	73.10	2.80	5.10	3.60
12.50	50.90	6.20	0.90	0.80
6.25	18.40	4.80	0.70	1.40
3.13	3.00	1.90	0.10	0.20
1.56	0.10	0.00	0.00	0.20
0.00	0.00	0.20	0.30	0.30

【０４９３】

【表１３－１】

表12	
マーカー名	カタログ番号*
AFP	Hs00173490_m1
CD99	Hs00365982_m1
CD9	Hs00233521_m1
CDH1	Hs00170423_m1
CDH2	Hs00169953_m1
CDX2	Hs00230919_m1
CER1	Hs00193796_m1
CXCR4	Hs00237052_m1
FGF17	Hs00182599_m1
FGF4	Hs00173564_m1
FOXA2	Hs00232764_m1
GAPDH	Hs99999905_m1
GATA4	Hs00171403_m1
GATA6	Hs00232018_m1
GSC	Hs00418279_m1
HLXB9	Hs00232128_m1
KIT	Hs00174029_m1
MIXL1	Hs00430824_g1
NANOG	Hs02387400_g1
OTX2	Hs00222238_m1
POU5F1	Hs00742896_s1
SOX17	Hs00751752_s1
SOX7	Hs00846731_s1
T	Hs00610080_m1
ALB	Hs00609411_m1

【０４９４】

【表１３－２】
（上記表の続き）

表12	
マーカー名	カタログ番号*
AMY2A	Hs00420710_g1
ARX	Hs00292465_m1
CDX2	Hs00230919_m1
GAPDH	Hs99999905_m1
GCG	Hs00174967_m1
HNF4A	Hs00230853_m1
INS	Hs00355773_m1
ISL1	Hs00158126_m1
MAFA	Hs01651425_s1
MAFB	Hs00534343_s1
NeuroD1	Hs00159598_m1
NEUROG3	Hs00360700_g1
NKX2－2	Hs00159616_m1
NKX2－5	Hs00231763_m1
NKX6－1	Hs00232355_m1
PAX4	Hs00173014_m1
PAX6	Hs00240871_m1
PDX1	Hs00236830_m1
PECAM1	Hs00169777_m1
POU3F4	Hs00264887_s1
PTF1A	Hs00603586_g1
SST	Hs00356144_m1
ZIC1	Hs00602749_m1

【０４９５】

【表１４】

表13																								
分化工程1	CT値																							
処理	GAPDH	AFP	CD9	CD99	CDH1	CDH2	CDX2	CER1	CXCR4	FGF17	FGF4	FOXA2	GATA4	GATA6	GSC	KIT	MIXL1	MNX1	NANOG	OTX2	POU5F1	SOX17	SOX7	T
AA／Wnt3a	19.5	34.7	23.8	24.1	24.5	21.5	36.8	18.4	22.7	20	33.5	24.7	23.7	22.1	22.3	25	23.4	28	23.8	22.6	31.4	23.5	32.2	32.3
GDF8／Wnt3a	18.7	36.1	23	23.5	23.3	21	36.2	17.8	21.9	19.9	33.1	23.8	23.7	21.9	22.1	23.9	23.1	28.6	23	21.9	29.6	23.4	31.9	32.2
GDF8／化合物34	18.5	33	23	23.1	23.6	20.9	35.3	17.9	21.3	19.7	32.6	24	23.2	21.7	21.9	24	23	27.5	23.2	21.5	30.1	23.2	31.7	32.1
GDF8／化合物56	17	31.2	20.8	20.9	21.2	18.4	35.3	15.5	19.4	17.2	29.7	21.1	20.8	19.6	20	21.5	21.5	25	21.1	19.3	27.9	21.8	31.1	30.3
分化工程3	CT値																							
処理＼CTs	GAPDH	ALB	AMY2A	ARX	CDX2	GCG	HNF4	INS	ISL1	MAFA	MAFB	NEUROD1	NEUROG3	NKX2－2	NKX2－5	NKX6－1	PAX4	PAX6	PDX1	PECAM1	POU3F4	PTF1A	SST	ZIC1
AA／Wnt3a	18.7	23.1	30.2	30.8	22.4	34.1	21.1	34.9	27.9	35.1	26.8	30.6	28	29.3	33.1	38.5	30.6	36	25.6	28.3	29.5	38.4	30.3	32.7
GDF8／Wnt3a	18.4	23.1	29.7	30.9	22.5	34.5	21.1	34.7	27.4	34.6	26.9	30.5	28	30	36.4	36	31.1	33.5	25.4	30.4	30.1	38.5	27.9	32.4
GDF8／化合物34	18.4	23.3	29.7	34.7	22.5	36.6	21.1	38.1	27.5	34.2	26.8	33.3	31	32.2	33.8	37.8	33.2	36.5	26.3	28.1	31.1	36.4	27.6	33.2
GDF8／化合物56	18.2	23.5	29.7	31.6	22.5	36.3	21.2	35.7	27.3	34.4	27	30.6	27.9	30	33.8	38.2	30.8	32.7	25	28.9	30.4	34.8	27.5	32.7
分化工程4	CT値																							
処理＼CTs	GAPDH	ALB	AMY2A	ARX	CDX2	GCG	HNF4	INS	ISL1	MAFA	MAFB	NEUROD1	NEUROG3	NKX2－2	NKX2－5	NKX6－1	PAX4	PAX6	PDX1	PECAM1	POU3F4	PTF1A	SST	ZIC1
AA／Wnt3a	18.3	18.3	27.1	23.8	21.7	19.5	20.6	20.5	23.3	31	23.8	23	27.9	24.6	31.5	31.5	27.5	26.4	24.1	26.9	27.6	40	25.2	31.4
GDF8／Wnt3a	18.9	19.3	27.7	24.1	22.2	19.9	21.2	20.7	23.7	31.2	24.2	23.5	27.8	25	35.4	31.5	27.7	26.3	24.5	29.5	29.3	38.2	24.9	31.4
GDF8／化合物34	18.9	18.9	27.1	25	22.3	21.5	21	22.2	24.4	31.3	24.6	24.6	29.7	25.8	31.6	29.6	27.9	26.4	23.9	27.5	28.1	37.1	24.7	29.5
GDF8／化合物56	18.3	18.8	27.1	22.3	22.6	17.6	21.3	18.6	22.4	29.9	22.9	22.7	25.5	23.2	32	27.9	25.5	23.8	23.2	27.8	27.5	30.9	22.8	32.1
分化工程5	CT値																							
処理＼CTs	GAPDH	ALB	AMY2A	ARX	CDX2	GCG	HNF4	INS	ISL1	MAFA	MAFB	NEUROD1	NEUROG3	NKX2－2	NKX2－5	NKX6－1	PAX4	PAX6	PDX1	PECAM1	POU3F4	PTF1A	SST	ZIC1
AA／Wnt3a	18.3	18.5	27.8	24	22.3	18.2	21.4	16.5	23.4	31.3	23.7	24.1	32.5	25.4	29.7	32	28	25.1	24.2	26.9	29	37.5	22.5	29.9
GDF8／Wnt3a	19.3	19.7	28.5	24.2	23.1	18.2	22	16.7	23.4	31.1	23.4	24.6	32.3	25.6	29.9	30.5	28.1	25.4	24.6	29.9	29.9	33.4	22.1	32.1
GDF8／化合物34	19.9	20.6	29	24.1	23.7	17.8	22.4	16.3	23.7	31.3	24	24.4	32.4	25.8	31.3	32	28.4	25.6	24.6	29.7	30.7	34.5	21.6	35
GDF8／化合物56	20	21.1	29	25.1	24.8	18.3	23.2	17.1	24.6	32.1	24.9	24.8	33.8	26.3	34	30.2	29.7	27.3	25.9	29.7	31.5	34.7	22.1	33.3
分化工程6	CT値																							
処理＼CTs	GAPDH	ALB	AMY2A	ARX	CDX2	GCG	HNF4	INS	ISL1	MAFA	MAFB	NEUROD1	NEUROG3	NKX2－2	NKX2－5	NKX6－1	PAX4	PAX6	PDX1	PECAM1	POU3F4	PTF1A	SST	ZIC1
AA／Wnt3a	20.4	24.3	30.7	27.6	25.7	19.4	24.7	20.5	26.4	34.6	27.2	27.1	40	29.6	30.7	33.4	30.9	28.6	29.2	31.3	32.8	38.4	22.2	34.8
GDF8／Wnt3a	20.7	23.5	30.4	26.8	25.2	18.4	24.3	19.3	26.2	35.2	26.3	26.5	35	29	32.3	30.5	30.7	27.8	28.5	32.3	31.5	33.9	22.4	27.4
GDF8／化合物34	21.3	24.6	31.3	27.1	26	18.4	24.7	20.1	26.3	34.8	26.4	27	34.5	29.2	31.6	33.1	30.4	28.1	29	32.9	33.9	37.7	22.1	34.5
GDF8／化合物56	21.2	25	30.9	26	25.9	17.4	24.4	19.6	25.7	34.7	25.9	26.1	34.3	28.1	33.8	30.7	29.3	27.2	27.9	33.6	33.2	35.2	21	34.9

【０４９６】

【表１５】

表14

分化工程1

処理	GAPDH	AFP	CD9	CD99	CDH1	CDH2	CDX2	CER1	CXCR4	FGF17	FGF4	FOXA2	GATA4	GATA6	GSC	HLXB9	KIT	MIXL1	NANOG	OTX2	POU5F1	SOX17	SOX7	T
	CT値																							
AA／Wnt3a	20	35.6	24.1	24.2	26	20.9	40	17.5	22.7	19.8	35.8	24.7	23.8	22.1	21.6	23.4	23.2	28.1	24.5	22	32.6	23.2	33	36.8
GDF8／Wnt3a	20.1	34	23.8	24.5	24.6	21.6	40	19.5	23.3	21	34.8	25.1	24.5	23.3	23.3	17.6	25.5	28.3	24.9	23	31	23.7	33.3	34.2
GDF8／GSK3インヒビターBIO	19	34.4	23.7	24.1	24.3	21.3	36	18.7	23	20.1	33.5	24.2	24.2	22.4	21.8	23.4	24.2	28.4	23.7	21.8	30.8	23	33.7	33.1
GDF8／化合物19	19.8	34.8	23.8	24	24.6	20.7	37.7	18.8	22.3	20	34.4	24.2	23.6	22.5	21.9	23.1	24.3	28	24.3	21.8	31.3	22.3	33	32.9
GDF8／化合物202	19.8	40	24.5	23.5	25.9	20.8	40	18.8	22.2	20.3	36.5	24.4	23.4	22.3	22.3	24	24.8	27.3	26	21.9	33.3	22.7	32.6	32.1
GDF8／化合物40	19.8	36.1	24.3	22.9	26.2	21.6	33.3	18.8	22.5	20.3	38.1	25.3	23.4	23	23	25	25.7	27.8	26	22.3	32.8	23.2	27.2	29.3

分化工程3

処理	GAPDH	ALB	AMY2A	ARX	CDX2	GCG	HNF4A	INS	ISL1	MAFA	MAFB	NEUROD1	NEUROG3	NKX2−2	NKX2−5	NKX6−1	PAX4	PAX6	PDX1	PECAM	POU3F4	PTF1A	SST	ZIC1
	CT値																							
	17.9	25.4	29.5	28.4	23.3	34.1	21.8	29.2	29.4	34	27	25.8	25.2	27.3	34.1	28.3	27.8	35.2	22.7	28.3	28.6	30.8	32.2	37.4
GDF8／Wnt3a	18.5	26.5	30.4	29.4	23.9	34.2	22.6	29	29	34.4	27.1	27.2	26.4	27.9	37.8	29	29.2	31.4	23.3	32.2	30.1	30.7	31	30.1
GDF8／GSK3インヒビターBIO	18.5	25.2	30.3	29.4	23.6	32.8	22.6	28.8	29.3	34.7	27.6	26.8	26.2	27.6	35	28.8	28.7	32.9	23.2	32.2	29.5	30.6	31.3	31.1
GDF8／化合物19	18.4	26.1	30.2	29.1	24	33.1	22.5	28.5	30	34.4	27.3	26.6	25.9	27.5	37.6	27.8	28.3	33.8	22.9	31.7	29.7	30	32.4	33.4
GDF8／化合物202	18.7	26.7	31.1	29.6	24	34.9	22.7	30.3	31.6	34.2	27.8	27.2	27	28	40	30	29	36.2	23.7	30.9	30.2	32.4	32.4	34.6
GDF8／化合物40	18.6	25.8	30.5	29.6	23.8	37.6	22.5	30.0	31.1	34.5	27.9	27.2	26.2	27.8	37.2	29.5	29	37.1	23.2	31.5	30.2	31.5	32.4	35.5

分化工程4

処理	GAPDH	ALB	AMY2A	ARX	CDX2	GCG	HNF4A	INS	ISL1	MAFA	MAFB	NEUROD1	NEUROG3	NKX2−2	NKX2−5	NKX6−1	PAX4	PAX6	PDX1	PECAM	POU3F4	PTF1A	SST	ZIC1
	CT値																							
AA／Wnt3a	31.1	34.5	27.9	24.6	23.4	21.7	21.9	21.6	25.2	32.4	24.9	23.7	23.8	24.2	33.9	25.6	25.6	27	23	29.2	27	28.1	25.3	32.6
GDF8／Wnt3a	18.3	21.3	28.5	25.3	23.1	22.6	21.9	21.9	25.7	33.1	24.9	24.3	24.2	24.7	35.4	25.8	26.2	27.3	23.2	31.2	27	28.7	24.7	24.6
GDF8／GSK3インヒビターBIO	19	21.1	28.7	25.3	23.3	22.3	21.9	22	25.7	32.5	25.4	24	24	24.7	35.4	26.1	26	27.7	23.2	30.7	27.4	28.5	25.6	31.5
GDF8／化合物19	18.9	21.7	28.9	25.2	23.5	22.4	22.2	22	25.6	34	25.4	24.1	23.9	24.6	35.9	25.7	25.7	27.8	23.1	31.4	27.1	28.6	25.5	31.4
GDF8／化合物202	19	20.9	29.2	25.1	23.6	22.4	22.1	22	25.5	33.3	25.5	23.9	24.1	24.5	35.7	26	25.8	27.6	23.4	30.2	27.5	28.8	26.1	35.7
GDF8／化合物40	19.2	21.1	29.4	25.5	23.7	22.8	22.3	22.3	26	33.5	25.8	24.2	24.2	24.6	37.3	25.9	25.9	28.4	23.1	30.4	27.6	28.4	26.3	34.4

分化工程5

処理	GAPDH	ALB	AMY2A	ARX	CDX2	GCG	HNF4A	INS	ISL1	MAFA	MAFB	NEUROD1	NEUROG3	NKX2−2	NKX2−5	NKX6−1	PAX4	PAX6	PDX1	PECAM	POU3F4	PTF1A	SST	ZIC1
	CT値																							
AA／Wnt3a	19.1	19.5	28.6	23.1	23.9	16.2	21.9	16.9	23.4	23.4	23.3	21.7	27.4	24	33.1	25	26.4	24.7	22.6	27.1	28.4	27.5	22	34.1
GDF8／Wnt3a	18.4	19.9	28.4	23.8	23.8	17.2	22.3	17.4	24	24	23.9	22.6	28.6	24.2	33.1	25.8	27.2	25.6	23.6	29.2	28.9	29.1	22.7	25.6
GDF8／GSK3インヒビターBIO	19.1	19.2	29.1	24	24.2	17.2	22.4	17.6	24	24	23.8	22.9	28.4	24.4	40	25.1	27.3	25.6	23.6	29.2	28.1	28.7	23	26.3
GDF8／化合物19	19	20	28.8	23.4	24.2	17	22.6	17.1	23.8	23.8	23.8	22.8	28.6	24.1	34.6	25	26.8	25.6	23.4	29.8	28.2	28.2	22.9	28.8
GDF8／化合物202	19.2	20	29	23	23.9	16.7	22.2	16.8	23.2	23.2	23.8	22.3	28.2	23.2	40	26	27.2	25.8	23.4	29.9	29.1	28.4	22.6	33.8
GDF8／化合物40	19.6	19.5	29	23.7	24.2	16.9	22.2	17.1	23.9	23.9	23.9	22.5	28.1	23.5	34.8	25	27.3	26.4	23.4	29.9	29.2	27.5	22.3	34.8

【０４９７】

【表１６－１】

表15																								
工程1	RT−PCR CT値																							
処理	GAPDH	AFP	CD9	CD99	CDH1	CDH	CDX2	CER1	CXCR4	FGF17	FGF4	FOXA2	GATA4	GATA6	GSC	HLXB9	KIT	MIXL1	NANOG	OTX2	POU5F1	SOX17	SOX7	T
AA	19.4	32.8	25.2	24.0	26.1	21.8	36.0	18.3	20.4	20.7	34.0	25.1	25.0	22.9	22.4	24.8	22.7	28.9	24.1	22.5	32.2	21.6	32.3	36.1
AA+ Wnt3a	18.2	40.0	23.5	22.0	24.1	20.9	40.0	17.1	22.0	18.7	33.4	22.9	23.1	21.8	22.8	23.3	22.9	27.7	22.7	19.9	31.0	21.2	31.2	34.1
AA+ 化合物181	20.1	40.0	24.5	23.3	26.0	20.7	35.9	18.2	22.0	20.1	35.1	25.6	24.7	22.9	20.8	25.5	19.7	27.8	24.8	22.3	32.8	22.2	33.0	33.8
AA+ 化合物180	18.4	34.2	23.6	21.6	25.9	21.4	35.2	17.2	22.0	18.9	34.0	24.0	23.1	22.6	22.5	24.8	22.6	27.9	23.7	20.3	32.1	21.4	32.0	32.7
AA+ 化合物19	20.1	35.4	24.4	24.9	26.3	20.8	40.0	17.9	17.7	20.5	32.8	25.6	25.1	22.7	21.3	26.0	22.6	29.5	24.1	22.9	32.1	22.3	33.0	29.6
AA+ 化合物202	20.3	40.0	25.1	23.7	25.9	21.4	40.0	18.3	22.0	20.4	36.0	25.7	24.5	23.0	21.8	25.2	23.9	27.7	24.5	22.5	32.7	22.6	32.1	33.5
AA+ 化合物40	19.9	40.0	24.6	23.6	25.8	20.4	40.0	17.7	22.7	20.2	35.1	25.5	24.6	22.5	20.9	25.5	22.9	28.0	23.8	22.0	33.6	22.3	32.5	32.8
AA+ GSK3 インヒビターBIO	20.2	35.0	25.4	23.7	27.2	21.9	35.5	18.5	22.2	20.9	36.0	25.8	25.0	23.2	22.2	25.2	23.7	28.5	24.9	22.8	34.3	23.4	32.7	33.5
AA+ 化合物206	19.8	40.0	24.9	23.7	25.5	21.1	40.0	18.3	19.6	20.7	36.2	24.4	24.8	22.7	22.6	24.1	23.7	27.6	23.9	22.0	33.2	23.3	32.4	34.6
GDF8	21.6	40.0	25.5	25.9	25.2	22.3	40.0	20.1	24.6	22.1	34.9	25.9	27.5	24.8	24.2	25.3	25.4	30.6	25.0	24.3	29.5	25.2	29.8	32.9
GDF8+ Wnt3a	21.2	40.0	25.0	25.8	25.1	22.6	40.0	19.7	24.6	22.0	34.8	25.7	27.3	24.4	23.8	25.0	25.1	30.5	24.8	24.4	31.1	25.0	34.5	32.6
GDF8+ 化合物181	20.7	40.0	25.1	23.6	25.5	22.4	40.0	20.0	23.6	21.5	36.3	25.2	25.4	23.9	23.6	24.3	26.3	28.1	25.4	23.3	31.8	23.7	32.8	31.9
GDF8+ 化合物180	20.9	40.0	25.6	24.0	26.9	22.1	34.7	19.9	23.0	21.1	36.6	25.0	25.2	23.9	23.6	24.2	25.8	28.3	26.3	23.0	33.2	24.2	32.8	32.3
GDF8+ 化合物19	19.6	40.0	23.9	23.7	24.6	20.7	40.0	18.0	22.7	20.4	33.2	24.2	25.0	22.8	22.1	24.0	22.6	28.5	23.1	22.7	30.3	22.6	32.1	29.3
GDF8+ 化合物202	18.5	30.6	22.1	20.2	22.8	19.7	35.8	18.5	21.8	19.9	34.3	23.6	22.7	22.5	23.5	23.1	25.9	27.7	25.1	21.5	30.0	22.3	32.0	32.5
GDF8+ 化合物40	19.7	40.0	23.0	22.6	24.7	20.5	33.8	18.2	22.4	20.5	35.4	24.9	24.2	22.6	23.4	23.4	25.4	28.5	24.0	22.2	31.6	23.7	31.2	32.7
GDF8+ GSK3 インヒビターBIO	19.6	30.1	23.1	21.8	24.3	20.0	33.4	17.7	23.3	20.1	34.8	24.7	24.5	22.4	22.7	24.1	25.0	29.3	24.8	21.8	31.7	23.3	33.7	34.6
GDF8+ 化合物206	19.7	40.0	22.7	22.5	23.2	21.0	29.9	18.4	23.0	20.3	34.5	25.3	24.9	22.9	23.6	23.8	25.7	29.7	24.7	22.2	30.7	24.4	32.8	33.8
工程3	RT−PCR CT値																							
処理	GAPDH	ALB	AMY2A	ARX	CDX2	GCG	HNF4	INS	ISL1	MAFA	MAFB	NEUROD1	NEUROG3	NKX2−2	NKX2−5	NKX6−1	PAX4	PAX6	PDX1	PECAM	POU3F4	PTF1A	SST	ZIC1
AA	18.5	26.9	30.6	32.0	22.9	34.1	22.4	34.8	29.3	36.4	27.4	30.1	28.0	29.3	34.6	32.2	31.4	40.0	23.3	31.0	30.5	34.6	33.2	34.8
AA+ Wnt3a	18.4	27.3	30.2	33.0	23.0	34.7	22.4	40.0	28.8	33.9	27.7	30.4	28.1	29.0	40.0	34.9	31.9	38.1	23.8	30.9	30.7	40.0	32.8	40.0
AA+ 化合物181	18.6	26.0	30.1	34.2	22.3	40.0	22.3	40.0	30.4	34.6	28.5	31.4	29.0	30.3	33.9	35.8	33.3	40.0	25.0	30.0	30.8	36.0	34.6	34.8
AA+ 化合物180	18.8	25.5	30.0	33.3	22.5	35.1	22.5	40.0	29.4	34.3	28.6	32.6	30.3	31.1	32.5	35.3	35.3	36.2	26.3	28.9	31.3	40.0	34.7	34.4
AA+ 化合物19	34.1	40.0	40.0	40.0	40.0	40.0	37.4	40.0	40.0	40.0	34.9	40.0	40.0	40.0	40.0	40.0	40.0	40.0	40.0	40.0	40.0	40.0	40.0	40.0
AA+ 化合物202	18.5	26.2	30.7	33.0	22.5	34.8	22.6	35.1	29.8	35.1	28.2	30.0	28.5	29.5	33.6	33.9	32.0	36.6	24.1	29.7	31.9	40.0	34.2	40.0

【０４９８】

【表１６－２】

（上記表の続き）

表15																								
AA+ 化合物40	18.5	25.8	30.1	34.9	22.2	40.0	22.3	40.0	29.7	34.1	28.1	30.8	29.1	30.3	33.6	34.4	32.9	40.0	24.8	30.3	31.3	35.6	35.3	35.4
AA+ GSK3 インヒビターBIO	18.5	24.9	30.1	34.6	22.0	40.0	21.5	40.0	30.2	34.9	27.8	34.0	31.0	31.8	32.6	40.0	34.9	40.0	26.1	31.0	32.4	40.0	35.2	34.9
AA+ 化合物206	18.3	27.0	30.3	33.7	22.7	35.7	22.5	40.0	28.4	34.4	27.8	30.7	28.6	29.8	32.8	35.0	31.5	30.4	23.9	29.7	31.2	35.0	31.9	40.0
GDF8	18.0	28.7	30.4	35.3	23.8	40.0	23.6	40.0	28.5	33.6	27.2	30.3	28.7	30.3	34.4	35.0	32.4	24.8	25.5	30.0	30.8	34.2	29.5	26.1
GDF8+ Wnt3a	17.4	27.0	29.5	33.8	23.1	35.1	22.4	40.0	26.3	30.5	26.1	30.1	27.5	29.1	40.0	32.9	31.5	25.8	23.1	32.2	29.8	34.0	27.7	28.2
GDF8+ 化合物180	18.8	27.3	30.6	32.4	22.8	34.9	22.7	40.0	29.5	35.9	27.7	30.0	27.5	29.0	35.4	32.6	31.2	40.0	23.7	31.6	30.8	34.6	34.4	40.0
GDF8+ 化合物19	18.3	24.9	29.7	33.4	22.0	40.0	22.2	40.0	29.7	34.5	28.4	33.3	31.5	32.2	34.4	35.2	34.4	35.0	25.0	29.4	31.6	40.0	34.1	33.5
GDF8+ 化合物202	18.7	27.8	30.4	32.8	23.8	40.0	22.9	34.6	28.5	34.2	27.6	29.6	27.1	28.4	35.7	30.5	30.4	31.8	23.0	30.1	30.2	31.6	30.9	34.0
GDF8+ 化合物40	18.4	27.7	30.1	32.5	23.0	35.1	22.4	40.0	29.1	34.3	27.5	30.0	27.3	28.8	35.3	32.9	31.5	40.0	23.2	29.2	30.5	36.3	33.7	40.0
GDF8+ GSK3 インヒビターBIO	18.4	24.9	30.3	31.5	22.2	34.7	21.7	34.5	29.9	35.3	27.6	29.2	26.8	27.9	34.6	33.9	30.6	35.1	24.0	30.4	30.0	34.8	33.6	40.0
GDF8+ 化合物206	18.2	27.6	30.2	33.5	23.8	40.0	22.9	40.0	27.9	35.1	27.1	29.9	27.7	29.3	40.0	32.3	31.3	27.4	23.3	32.7	30.8	33.0	29.2	30.3
工程4	RT−PCR CT値																							
処理	GAPDH	ALB	AMY2A	ARX	CDX2	GCG	HNF4	INS	ISL1	MAFA	MAFB	NEUROD1	NEUROG3	NKX2−2	NKX2−5	NKX6−1	PAX4	PAX6	PDX1	PECAM	POU3F4	PTF1A	SST	ZIC1
AA	19.0	22.4	28.6	23.9	23.7	22.8	22.1	23.6	24.1	30.6	23.5	23.7	23.3	24.0	31.9	27.4	25.7	27.1	23.7	29.8	26.5	29.6	24.3	32.5
AA+ Wnt3a	19.5	23.5	29.3	24.6	24.1	25.1	22.7	25.2	25.1	31.1	24.4	24.4	24.1	24.5	31.8	27.5	26.1	27.9	24.1	30.4	27.2	31.1	25.9	32.4
AA+ 化合物181	18.0	21.0	27.7	24.0	22.1	24.5	21.0	24.6	24.5	31.6	24.0	24.2	24.6	24.6	30.9	28.1	26.3	28.0	24.0	27.9	27.5	31.0	25.5	31.2
AA+ 化合物180	19.4	21.0	27.3	26.3	21.6	25.4	20.6	26.7	26.1	34.7	24.6	25.5	25.8	25.0	29.4	28.9	27.7	28.9	24.0	26.7	28.5	32.6	27.1	31.2
AA+ 化合物19	(RNAサンプルが不十分)																							
AA+ 化合物202	19.2	20.7	29.1	24.0	23.3	21.8	21.9	22.7	24.4	31.1	23.9	24.0	24.1	24.4	32.1	27.4	26.3	26.9	24.3	29.6	27.7	29.5	24.0	35.1
AA+ 化合物40	19.2	20.8	29.4	24.7	22.9	22.2	21.8	23.5	25.3	31.5	24.7	24.7	25.3	25.0	32.2	28.7	27.1	28.2	25.1	30.3	28.5	31.2	25.6	32.7
AA+ GSK3 インヒビターBIO	19.0	19.1	29.2	26.7	22.7	25.2	21.1	26.3	26.5	33.0	25.4	26.3	27.7	26.2	31.5	32.9	29.4	30.0	26.5	29.6	30.5	33.7	27.2	32.4
AA+ 化合物206	18.8	20.9	28.4	23.3	22.9	21.2	21.7	22.8	24.0	30.4	23.5	23.3	23.3	23.8	31.9	27.2	25.5	26.3	23.6	29.7	26.6	29.3	23.6	32.9
GDF8	18.0	25.5	29.1	29.8	24.6	31.3	23.8	30.9	27.6	32.8	24.1	29.2	28.7	29.0	32.3	31.2	31.1	27.9	26.5	29.4	29.4	40.0	26.0	22.8

【０４９９】

【表１６－３】

（上記表の続き）

表15																							
GDF8＋ Wnt3a	19.0	24.3	29.0	25.4	24.4	27.7	23.0	25.5	25.4	32.7	25.1	25.4	24.0	25.0	33.3	28.0	26.7	28.8	23.8	33.4	27.7	30.5	24.1	29.0
GDF8＋ 化合物181	18.0	22.8	28.1	23.5	23.1	24.6	21.4	22.7	23.8	30.6	23.0	22.9	21.8	23.2	32.1	25.7	24.2	27.0	22.3	27.6	25.4	28.6	24.2	31.6
GDF8＋ 化合物180	19.5	24.0	29.3	24.4	23.9	25.7	22.5	24.5	24.7	31.4	24.4	24.3	23.7	24.4	33.5	27.7	26.0	28.3	23.8	30.6	26.9	30.7	26.3	33.4
GDF8＋ 化合物19	19.1	22.6	28.7	25.5	22.9	26.7	22.1	27.2	25.8	32.6	25.5	26.2	26.4	25.6	34.0	30.2	28.2	30.0	25.1	30.2	29.2	32.6	27.9	31.1
GDF8＋ 化合物202	19.0	22.0	28.9	23.7	24.5	21.8	22.3	21.7	24.3	30.3	23.5	22.9	22.2	23.4	33.4	25.9	24.8	26.5	23.0	29.5	26.1	27.9	22.4	34.1
GDF8＋ 化合物40	19.0	21.4	29.0	23.4	23.6	21.0	22.0	21.5	23.8	30.2	23.3	23.2	22.7	23.7	33.2	26.6	24.8	26.1	23.4	29.3	26.4	28.4	22.7	32.6
GDF8＋ GSK3 インヒビターBIO	19.1	19.4	29.1	24.3	23.0	21.5	21.4	21.8	24.6	31.0	24.0	23.8	23.8	24.2	33.3	27.9	26.1	27.0	24.2	30.0	27.8	29.5	23.4	32.7
GDF8＋ 化合物206	18.9	21.6	28.9	24.4	24.0	22.6	22.3	22.7	24.9	30.9	24.2	23.7	23.0	24.0	35.3	26.3	25.5	27.2	23.5	31.4	26.9	27.7	24.0	28.9
工程5	RT－PCR CT値																						
処理	GAPDH	ALB	AMY2A	ARX	CDX2	GCG	HNF4	INS	ISL1	MAFA	MAFB	NEUROD1	NEUROG3	NKX2－2	NKX2－5	NKX6－1	PAX4	PAX6	PDX1	PECAM	POU3F4	PTF1A	SST	ZIC1
AA	18.3	20.2	27.6	22.0	23.4	14.1	21.3	14.9	22.4	31.8	22.2	22.8	28.1	23.7	34.1	25.5	27.3	24.0	23.2	30.1	28.8	27.3	19.6	34.4
AA＋ Wnt3a	18.0	20.0	27.7	21.9	23.1	14.0	20.9	14.6	22.3	31.6	22.0	21.6	28.0	23.4	34.8	26.1	27.3	23.7	23.3	29.6	28.8	27.5	19.4	32.5
AA＋ 化合物181	18.0	18.8	27.6	22.0	22.9	14.3	20.9	14.5	22.1	31.4	22.2	21.5	28.9	23.3	32.2	26.1	26.8	24.0	23.1	27.5	28.8	28.0	18.8	31.2
AA＋ 化合物180	18.0	18.8	27.6	22.4	22.9	14.9	21.0	14.7	22.4	31.9	22.6	21.7	29.5	23.8	30.2	26.5	27.2	24.3	23.2	26.7	29.0	28.7	18.7	30.3
AA＋ 化合物19	17.9	23.6	28.6	28.2	25.4	27.0	24.2	26.9	26.2	32.0	24.4	27.2	31.2	28.0	30.1	25.8	35.1	28.6	29.4	31.5	28.2	32.4	23.1	24.0
AA＋ 化合物202	18.6	19.2	28.0	22.6	23.4	14.9	21.3	15.0	22.7	31.8	22.6	21.9	28.6	23.7	29.9	25.8	26.9	24.7	23.6	27.7	29.2	27.9	19.4	32.8
AA＋ 化合物40	18.3	18.9	27.9	22.3	23.0	14.6	21.1	14.7	22.5	31.5	22.4	21.6	29.0	23.5	32.9	26.1	27.1	24.4	23.2	28.1	29.2	28.1	19.1	31.9
AA＋ GSK3 インヒビターBIO	18.3	17.1	28.0	23.0	22.6	15.1	20.5	15.1	22.8	31.8	22.8	22.1	29.5	24.2	33.8	27.5	27.4	24.9	23.8	28.3	29.9	29.7	19.5	32.0
AA＋ 化合物206	18.2	19.5	27.9	22.2	23.4	14.4	21.3	14.8	22.5	31.1	22.4	21.7	28.0	23.6	35.8	25.9	27.1	24.1	23.3	29.0	28.7	27.5	19.7	32.7
GDF8	17.4	20.5	28.2	25.2	24.4	18.1	22.9	17.7	24.3	31.8	23.3	24.2	30.1	25.9	31.4	26.6	29.4	26.6	25.6	29.7	27.8	29.5	21.1	22.5
GDF8＋ Wnt3a	17.8	20.6	28.2	24.8	24.3	17.7	22.9	17.5	24.2	31.9	23.5	24.0	30.2	25.6	31.9	27.0	29.3	26.5	25.6	29.8	28.1	30.7	21.5	22.8
GDF8＋ 化合物181	18.0	19.1	27.6	22.4	23.4	14.5	21.2	14.8	22.5	31.5	22.6	21.7	27.4	23.4	33.8	25.0	26.8	24.4	23.0	27.5	28.8	27.3	19.5	31.9
GDF8＋ 化合物180	18.0	18.0	27.3	22.2	22.9	14.2	20.9	14.4	22.2	31.4	22.1	21.2	27.9	23.2	40.0	25.1	26.1	23.8	22.9	29.6	28.7	27.3	18.8	31.5
GDF8＋ 化合物19	18.3	18.5	27.8	23.4	23.0	16.2	21.2	15.6	23.2	32.2	23.2	22.6	31.2	24.3	33.9	28.6	27.3	25.2	24.2	29.0	30.1	31.0	20.5	31.9
GDF8＋ 化合物202	18.7	19.6	28.3	23.1	24.0	15.7	21.9	15.8	23.5	32.8	23.3	22.3	27.8	23.8	31.3	24.8	27.1	25.2	23.2	29.0	29.5	27.1	20.8	30.9
GDF8＋ 化合物40	18.1	18.7	27.9	22.3	23.0	14.8	21.1	14.8	22.6	31.5	22.5	21.5	27.3	23.2	33.2	25.0	26.6	24.1	22.9	27.3	28.9	27.4	20.4	32.0
GDF8＋ GSK3 インヒビターBIO	18.4	17.1	27.6	23.2	22.8	15.2	20.6	15.5	23.1	32.6	22.6	22.1	28.2	24.2	35.0	26.7	27.3	24.8	24.0	28.1	30.1	28.5	19.3	32.4
GDF8＋ 化合物206	18.0	20.0	27.9	23.4	24.0	16.0	22.1	16.0	23.6	32.1	22.9	22.8	28.5	24.4	30.5	25.9	27.5	25.4	24.0	29.7	28.3	28.0	20.8	23.9

【０５００】

【表１７】

表16	
化合物番号	主選択性
化合物6	GSK選択性
化合物7	GSK選択性
化合物8	GSK選択性
化合物9	CDK選択性
化合物57	Trk選択性
化合物41	GSK選択性
化合物42	CDK選択性
化合物10	CDK選択性
化合物34	陽性対照
化合物11	CDK選択性
化合物43	Trk選択性
化合物44	GSK選択性
化合物12	CDK選択性
化合物45	Trk選択性

【０５０１】

【表１８】

表17							
				細胞数		Sox17発現	
プレート	処理	化合物番号	化合物選択性	平均総細胞数	陽性対照%	平均総強度	陽性対照%
1	アクチビンA不含	なし	n／a	9809	67．8	−4．0E+05	−0．2
1	アクチビンA／Wnt3a	なし	n／a	14476	100．0	2．3E+08	100．0
1	GDF8不含	化合物11	CDK選択性	565	3．9	−1．1E+06	−0．5
1	GDF8不含	化合物44	GSK選択性	14	0．1	−1．1E+06	−0．5
1	GDF8不含	化合物43	Trk選択性	8610	59．5	−2．1E+05	−0．1
1	GDF8不含	化合物42	CDK選択性	8700	60．1	−2．4E+05	−0．1
1	GDF8不含	化合物57	Trk選択性	1222	8．4	−7．1E+05	−0．3
1	GDF8不含	化合物10	CDK選択性	7011	48．4	−6．6E+05	−0．3
1	GDF8不含	化合物41	GSK選択性	9995	69．0	5．9E+04	0．0
1	GDF8不含	化合物7	CDK選択性	3	0．0	−1．4E+06	−0．6
1	GDF8不含	化合物45	Trk選択性	8857	61．2	−4．5E+05	−0．2
1	GDF8不含	化合物6	GSK選択性	14827	102．4	−1．8E+05	−0．1
1	GDF8不含	化合物9	CDK選択性	7156	49．4	−4．2E+04	0．0
1	GDF8不含	化合物12	GSK選択性	13124	90．7	−2．3E+05	−0．1
1	GDF8不含	化合物8	GSK選択性	13235	91．4	3．8E+05	0．2
1	GDF8	化合物34	陽性対照	13926	96．2	2．6E+08	111．8
1	GDF8	化合物45	Trk選択性	9540	65．9	1．1E+08	47．9
1	GDF8	化合物7	GSK選択性	5296	36．6	7．0E+07	30．4
1	GDF8	化合物10	CDK選択性	4627	32．0	6．6E+07	28．6
1	GDF8	化合物6	GSK選択性	5118	35．4	5．8E+07	25．2
1	GDF8	化合物43	Trk選択性	6682	46．2	5．4E+07	23．4
1	GDF8	化合物42	CDK選択性	5686	39．3	4．9E+07	21．2
1	GDF8	化合物8	GSK選択性	5018	34．7	4．7E+07	20．4
1	GDF8	化合物9	CDK選択性	4816	33．3	4．5E+07	19．4
1	GDF8	化合物41	GSK選択性	4455	30．8	3．4E+07	14．8
1	GDF8	n／a	n／a	2856	19．7	2．2E+07	9．4
1	GDF8	化合物57	Trk選択性	2110	14．6	1．1E+07	4．8
1	GDF8	化合物11	CDK選択性	210	1．4	−4．9E+05	−0．2
1	GDF8	化合物44	GSK選択性	226	1．6	−9．5E+05	−0．4
1	GDF8	化合物12	CDK選択性	31	0．2	−1．3E+06	−0．6

【０５０２】

【表１９－１】

表18										
			細胞数				Sox17発現			
プレート	処理剤	化合物番号	平均総細胞数	SD	CV%	陽性対照%	平均総強度	SD	CV%	陽性対照%
1	アクチビンA不含（Wnt3a含有）	なし	15489	0	0.00	103.2	3.75E+07	0.00E+00	0.00	10.9
1	アクチビンA／Wnt3a	なし	15007	1991	13.27	100.0	3.45E+08	7.16E+07	20.75	100.0
1	GDF8	化合物206	20568	1683	8.18	137.1	5.19E+08	4.41E+07	8.51	150.3
1	GDF8	化合物207	19224	1091	5.68	128.1	2.54E+08	5.69E+07	22.41	73.6
1	GDF8	化合物19	12569	1524	12.13	83.8	2.40E+08	6.34E+07	26.44	69.5
1	GDF8	化合物23	8758	474	5.41	58.4	1.16E+08	9.07E+06	7.80	33.7
1	GDF8	化合物170	6460	2305	35.68	43.0	9.44E+07	6.98E+07	73.93	27.4
1	GDF8	化合物208	4848	1225	25.27	32.3	2.26E+07	2.15E+07	94.96	23.6
1	GDF8	化合物209	4831	1243	25.74	32.2	3.97E+07	1.61E+07	40.56	11.5
1	GDF8	化合物32	4338	1520	35.04	28.9	3.63E+07	3.27E+07	90.14	10.5
1	GDF8	化合物30	4679	435	9.29	31.2	3.47E+07	1.04E+07	30.03	10.1
1	GDF8	化合物223	3704	1077	29.08	24.7	3.45E+07	2.74E+07	79.43	10.0
1	GDF8	化合物2	4538	632	13.93	30.2	2.95E+07	2.81E+06	9.50	8.6
1	GDF8	化合物210	2645	817	30.88	17.6	2.90E+07	2.45E+07	84.73	8.4
1	GDF8	化合物24	5012	1263	25.21	33.4	2.64E+07	1.66E+07	62.95	7.7
1	GDF8	化合物211	5165	796	15.41	34.4	2.61E+07	5.02E+06	19.23	7.6
1	GDF8	化合物212	5476	1445	26.39	36.5	2.54E+07	1.18E+07	46.53	7.4
1	GDF8	化合物224	5188	761	14.67	34.6	2.46E+07	8.26E+06	33.56	7.1
1	GDF8	化合物225	4431	1149	25.92	29.5	2.45E+07	2.65E+07	108.19	7.1
1	GDF8	化合物13	3123	1508	48.27	20.8	2.44E+07	2.30E+07	94.13	7.1
1	GDF8	化合物213	1261	1028	81.49	8.4	2.07E+07	1.97E+07	95.03	6.0
1	GDF8	化合物52	4932	386	7.82	32.9	1.99E+07	6.90E+06	34.67	5.8
1	GDF8	化合物214	3345	335	10.01	22.3	1.93E+07	1.39E+07	72.18	5.6
1	GDF8	化合物51	4289	940	21.91	28.6	1.70E+07	1.10E+07	64.86	4.9
1	GDF8	化合物26	4896	545	11.14	32.6	1.65E+07	5.93E+06	36.02	4.8
1	GDF8	化合物226	3617	577	15.94	24.1	1.59E+07	4.96E+06	31.21	4.6
1	GDF8	化合物215	4326	165	3.81	28.8	1.45E+07	2.69E+06	18.53	4.2
1	GDF8	化合物31	3619	1011	27.92	24.1	1.36E+07	4.63E+06	34.15	3.9
1	GDF8	化合物216	3364	629	18.70	22.4	8.75E+06	2.30E+06	26.32	2.5
1	GDF8	化合物217	2859	544	19.03	19.1	8.75E+06	1.94E+06	22.16	2.5
1	GDF8	化合物218	1327	118	8.92	8.8	6.44E+06	9.70E+05	15.05	1.9
1	GDF8	化合物219	368	168	45.67	2.5	1.79E+06	1.29E+06	72.17	0.5
2	アクチビンA不含（Wnt3a含有）	なし	15778	0	0.00	103.2	2.24E+07	0.00E+00	0.00	6.7

【０５０３】

【表１９－２】

（上記表の続き）

表18										
			細胞数				Sox17発現			
プレート	処理剤	化合物番号	平均総細胞数	SD	CV%	陽性対照%	平均総強度	SD	CV%	陽性対照%
2	アクチビンA／Wnt3a	なし	15290	1119	7.32	100.0	3.37E+08	2.84E+07	8.44	100.0
2	GDF8	化合物202	20177	987	4.89	132.0	4.85E+08	1.94E+07	4.00	144.0
2	GDF8	化合物227	2911	4619	158.69	19.0	3.89E+07	6.69E+07	172.00	11.5
2	GDF8	化合物15	4383	1775	40.49	28.7	3.57E+07	3.57E+07	100.03	10.6
2	GDF8	化合物228	4043	1253	30.98	26.4	3.10E+07	2.53E+07	81.62	9.2
2	GDF8	化合物229	3451	892	25.85	22.6	1.80E+07	1.46E+07	81.07	5.4
2	GDF8	化合物4	3163	805	25.44	20.7	1.58E+07	3.54E+06	22.32	4.7
2	GDF8	化合物220	2791	1453	52.05	18.3	1.40E+07	9.00E+06	64.28	4.2
2	GDF8	化合物5	3137	1172	37.34	20.5	1.30E+07	7.52E+06	57.85	3.9
2	GDF8	化合物230	2624	248	9.46	17.2	1.24E+07	1.55E+07	124.73	3.7
2	GDF8	化合物231	4773	2651	55.55	31.2	1.22E+07	6.51E+06	53.37	3.6
2	GDF8	化合物232	3273	1290	39.41	21.4	1.18E+07	1.51E+07	127.98	3.5
2	GDF8	化合物221	1950	361	18.52	12.8	1.18E+07	1.54E+07	131.11	3.5
2	GDF8	化合物233	3041	180	5.93	19.9	1.12E+07	1.09E+07	97.44	3.3
2	GDF8	化合物147	3434	1199	34.91	22.5	1.12E+07	9.80E+06	87.75	3.3
2	GDF8	化合物234	2835	623	21.98	18.5	9.47E+06	5.67E+06	59.84	2.8
2	GDF8	化合物235	3391	2269	66.91	22.2	9.10E+06	6.51E+06	71.52	2.7
2	GDF8	化合物236	2868	561	19.57	18.8	6.73E+06	6.32E+06	93.82	2.0
2	GDF8	化合物33	2362	511	21.66	15.4	6.60E+06	2.45E+06	37.20	2.0
2	GDF8	化合物1	3213	166	5.16	21.0	6.48E+06	3.09E+06	47.67	1.9
2	GDF8	化合物53	2783	441	15.86	18.2	6.36E+06	2.89E+06	45.36	1.9
2	GDF8	化合物237	2973	292	9.83	19.4	6.02E+06	3.00E+06	49.79	1.8
2	GDF8	化合物238	2739	485	17.70	17.9	5.97E+06	6.10E+06	102.07	1.8
2	GDF8	化合物239	3156	667	21.15	20.6	5.60E+06	2.42E+06	43.24	1.7
2	GDF8	化合物240	3002	287	9.55	19.6	4.68E+06	3.13E+06	66.80	1.4
2	GDF8	化合物200	2308	209	9.04	15.1	4.39E+06	1.88E+06	42.83	1.3
2	GDF8	化合物222	1776	719	40.47	11.6	3.33E+06	2.52E+06	75.78	1.0
2	GDF8	化合物241	2949	446	15.14	19.3	3.29E+06	1.55E+06	47.03	1.0
2	GDF8	化合物242	385	184	47.83	2.5	1.08E+06	8.85E+05	81.61	0.3
2	GDF8	化合物243	249	55	22.21	1.6	2.53E+05	3.07E+05	121.25	0.1
2	GDF8	化合物204	250	21	8.38	1.6	1.36E+05	2.27E+04	16.66	0.0
3	アクチビンA不含（Wnt3a含有）	なし	15796	0	0.00	99.6	2.82E+07	0.00E+00	0.00	8.0

【０５０４】

【表１９－３】

（上記表の続き）

表18										
			細胞数				Sox17発現			
プレート	処理剤	化合物番号	平均総細胞数	SD	CV%	陽性対照%	平均総強度	SD	CV%	陽性対照%
3	アクチビンA／Wnt3a	なし	15867	785	4.95	100.0	3.54E+08	2.40E+07	6.77	100.0
3	GDF8	化合物34	6974	3723	53.38	44.0	2.07E+08	9.51E+07	45.85	58.6
3	GDF8	化合物185	10892	1552	14.24	68.6	1.53E+08	4.08E+07	26.72	43.1
3	GDF8	化合物35	7746	1873	24.17	48.8	1.35E+08	4.86E+07	36.08	38.0
3	GDF8	化合物22	6727	1927	28.64	42.4	1.06E+08	5.04E+07	47.73	29.8
3	GDF8	化合物34	4889	1152	23.57	30.8	4.31E+07	2.11E+07	48.95	12.2
3	GDF8	化合物184	4173	1758	42.14	26.3	3.94E+07	2.24E+07	56.78	11.1
3	GDF8	化合物223	4234	1604	37.88	26.7	3.55E+07	2.51E+07	70.56	10.0
3	GDF8	化合物37	4187	338	8.06	26.4	3.11E+07	1.56E+07	50.18	8.8
3	GDF8	化合物244	4479	1229	27.43	28.2	2.73E+07	1.52E+07	55.71	7.7
3	GDF8	化合物245	4725	99	2.09	29.8	2.59E+07	1.03E+07	39.90	7.3
3	GDF8	化合物246	3820	1091	28.57	24.1	2.30E+07	2.69E+07	117.08	6.5
3	GDF8	化合物247	3730	966	25.90	23.5	2.14E+07	1.04E+07	48.63	6.1
3	GDF8	化合物248	3875	445	11.48	24.4	2.13E+07	9.45E+06	44.45	6.0
3	GDF8	化合物25	3879	658	16.95	24.4	1.76E+07	1.21E+07	69.04	5.0
3	GDF8	化合物195	3703	405	10.94	23.3	1.61E+07	3.27E+06	20.34	4.5
3	GDF8	化合物227	2904	397	13.68	18.3	1.43E+07	1.35E+07	94.25	4.0
3	GDF8	化合物183	3306	969	29.32	20.8	1.35E+07	1.14E+07	84.25	3.8
3	GDF8	化合物187	2768	1426	51.51	17.4	1.35E+07	9.02E+06	66.67	3.8
3	GDF8	化合物201	3213	1114	34.66	20.3	1.35E+07	1.69E+07	125.02	3.8
3	GDF8	化合物197	3268	211	6.46	20.6	1.30E+07	5.25E+06	40.51	3.7
3	GDF8	化合物249	3840	348	9.06	24.2	1.29E+07	6.79E+06	52.72	3.6
3	GDF8	化合物141	2404	213	8.86	15.1	1.12E+07	4.95E+06	44.30	3.2
3	GDF8	化合物194	3177	354	11.14	20.0	9.75E+06	2.11E+06	21.63	2.8
3	GDF8	化合物250	3683	420	11.40	23.2	9.14E+06	4.78E+06	52.32	2.6
3	GDF8	化合物251	3021	668	22.10	19.0	8.41E+06	4.59E+06	54.60	2.4
3	GDF8	化合物20	2793	205	7.35	17.6	6.77E+06	1.86E+06	27.45	1.9
3	GDF8	化合物252	2580	135	5.24	16.3	6.20E+06	2.31E+05	3.72	1.8
3	GDF8	化合物253	2485	820	32.98	15.7	5.83E+06	1.47E+06	25.20	1.6
3	GDF8	化合物202	2095	518	24.71	13.2	5.75E+06	2.62E+06	45.66	1.6
3	GDF8	化合物21	371	294	79.19	2.3	2.36E+06	3.07E+06	129.78	0.7
4	アクチビンA不含（Wnt3a含有）	なし	16629	0	0.00	119.3	2.42E+07	0.00E+00	0.00	7.8

【０５０５】

【表１９－４】

（上記表の続き）

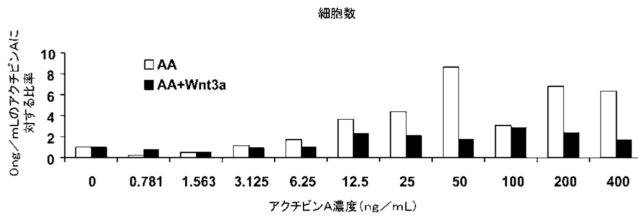
表18										
			細胞数				Sox17発現			
プレート	処理剤	化合物番号	平均総細胞数	SD	CV%	陽性対照%	平均総強度	SD	CV%	陽性対照%
4	アクチビンA／Wnt3a	なし	13945	1535	11.01	100.0	3.09E+08	4.77E+07	15.46	100.0
4	GDF8	化合物34	7416	6482	87.41	53.2	2.10E+08	1.82E+08	86.70	68.0
4	GDF8	化合物240	11283	2023	17.93	80.9	1.61E+08	4.41E+07	27.34	52.2
4	GDF8	化合物28	5236	1787	34.12	37.5	4.03E+07	3.08E+07	76.36	13.1
4	GDF8	化合物198	3985	2674	67.10	28.6	3.89E+07	5.55E+07	142.91	12.6
4	GDF8	化合物196	4861	1501	30.87	34.9	3.03E+07	1.98E+07	65.37	9.8
4	GDF8	化合物18	1921	1759	91.56	13.8	2.94E+07	3.65E+07	123.90	9.5
4	GDF8	化合物186	3486	425	12.19	25.0	2.34E+07	1.42E+07	60.78	7.6
4	GDF8	化合物254	3960	1521	38.42	28.4	2.31E+07	2.27E+07	98.10	7.5
4	GDF8	化合物168	3460	324	9.36	24.8	2.28E+07	7.13E+06	31.23	7.4
4	GDF8	化合物190	3402	1318	38.74	24.4	1.87E+07	1.58E+07	84.61	6.1
4	GDF8	化合物255	4006	1625	40.57	28.7	1.52E+07	1.05E+07	68.91	4.9
4	GDF8	化合物50	2666	743	27.86	19.1	1.48E+07	8.30E+06	56.15	4.8
4	GDF8	化合物27	3721	721	19.37	26.7	1.19E+07	9.69E+06	81.29	3.9
4	GDF8	化合物256	2922	1275	43.64	21.0	9.41E+06	8.65E+06	92.01	3.0
4	GDF8	化合物257	3182	705	22.14	22.8	8.06E+06	4.49E+06	55.75	2.6
4	GDF8	化合物258	2731	472	17.29	19.6	7.89E+06	7.24E+06	91.70	2.6
4	GDF8	化合物189	2350	1625	69.16	16.9	7.72E+06	5.36E+06	69.41	2.5
4	GDF8	化合物259	2195	955	43.49	15.7	6.92E+06	2.58E+06	37.29	2.2
4	GDF8	化合物260	2468	741	30.04	17.7	6.64E+06	3.33E+06	50.18	2.2
4	GDF8	化合物261	2965	456	15.38	21.3	6.23E+06	2.10E+06	33.61	2.0
4	GDF8	化合物192	2377	572	24.08	17.0	6.17E+06	2.76E+06	44.65	2.0
4	GDF8	化合物262	2894	399	13.78	20.8	5.75E+06	3.00E+06	52.20	1.9
4	GDF8	化合物188	3005	759	25.26	21.6	5.02E+06	3.97E+06	79.06	1.6
4	GDF8	化合物263	2129	230	10.79	15.3	4.77E+06	1.14E+06	23.93	1.5
4	GDF8	化合物264	2630	342	13.00	18.9	4.28E+06	2.17E+06	50.73	1.4
4	GDF8	化合物265	2636	1372	52.04	18.9	4.27E+06	1.15E+06	26.86	1.4
4	GDF8	化合物14	274	14	5.02	2.0	1.56E+05	9.51E+04	60.91	0.1
4	GDF8	化合物205	241	3	1.20	1.7	1.36E+05	6.83E+04	50.42	0.0
4	GDF8	化合物266	271	7	2.67	1.9	1.18E+05	3.34E+04	28.43	0.0
4	GDF8	化合物203	253	4	1.49	1.8	1.09E+05	3.49E+04	32.09	0.0

【０５０６】

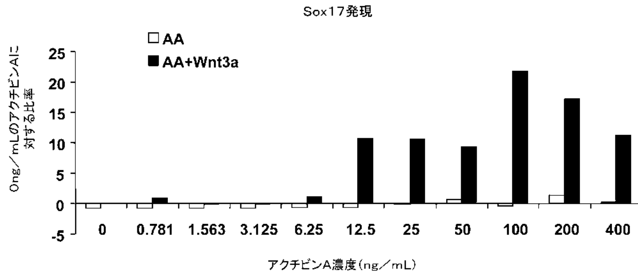
【表２０】

表19	
	Sox17発現
化合物番号	陽性対照%
化合物181	150.3
化合物202	144.0
化合物180	73.6
化合物19	69.5
化合物34	68.0
化合物40	52.2
化合物185	43.1
化合物185	38.0
化合物35	33.7
化合物23	29.8
化合物22	27.4
化合物17	23.6

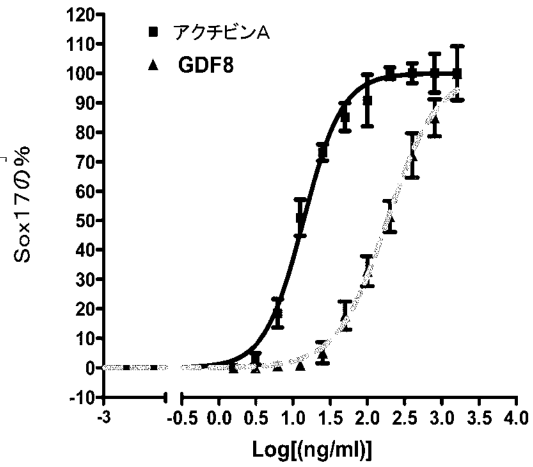
【図１Ａ】



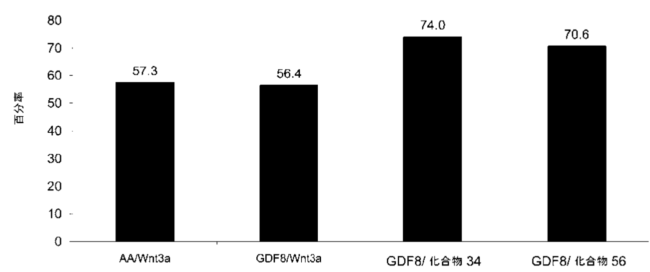
【図１Ｂ】



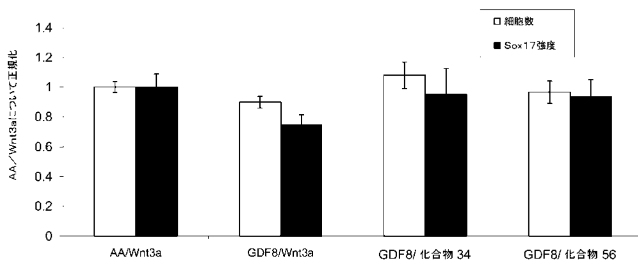
【図２】



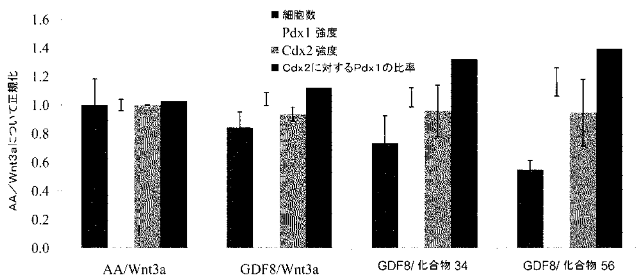
【図３】



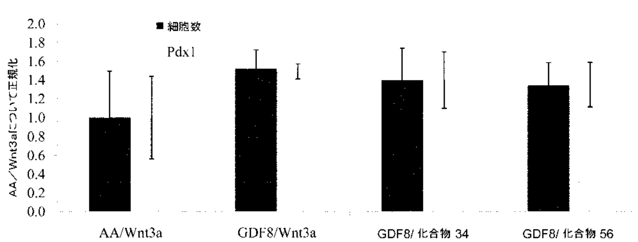
【図４】



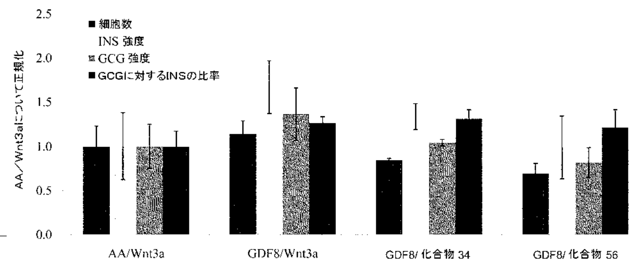
【図５】



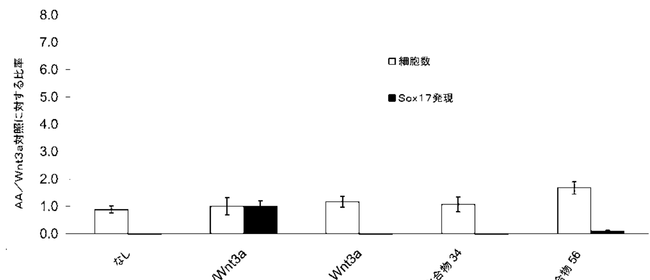
【図６】



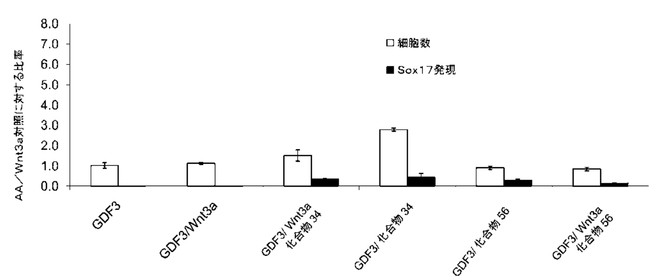
【図７】



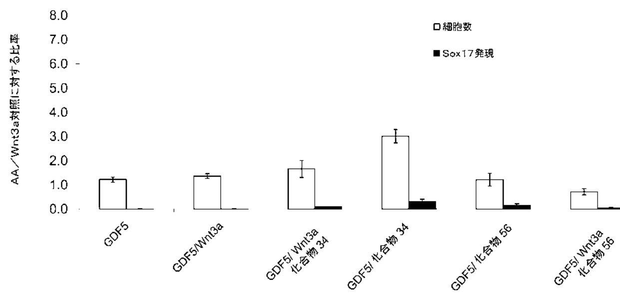
【図８Ａ】



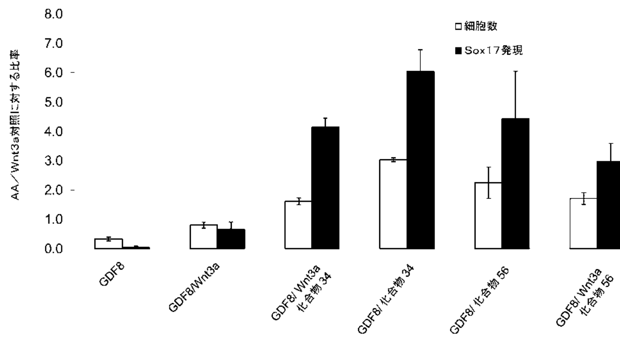
【図８Ｂ】



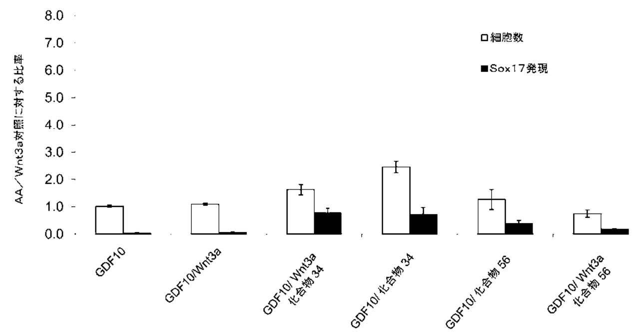
【図８Ｃ】



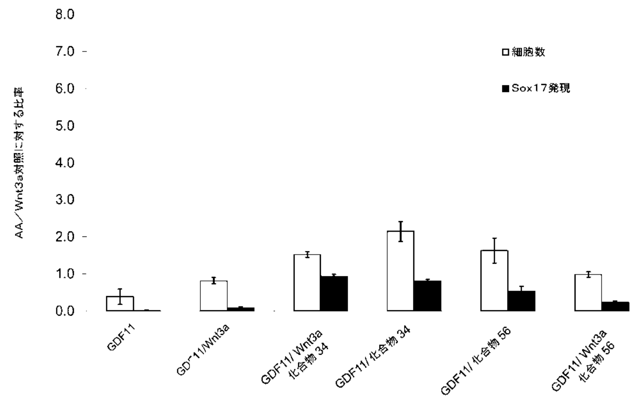
【図８Ｄ】



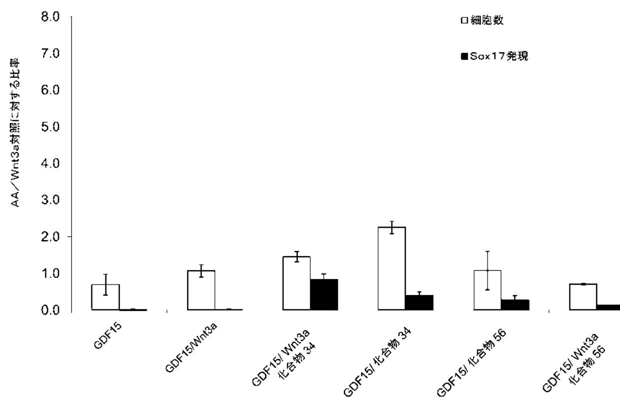
【図８Ｅ】



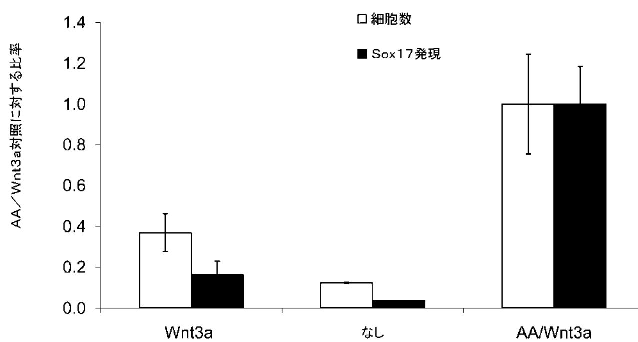
【図８Ｆ】



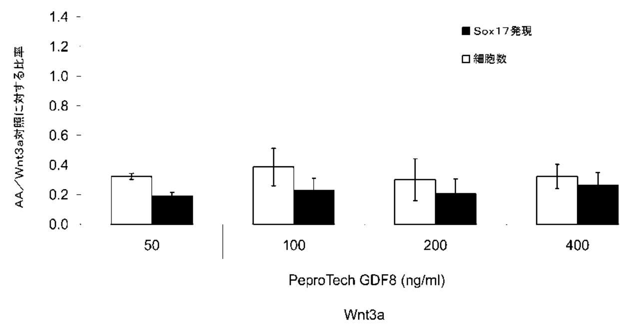
【図８Ｇ】



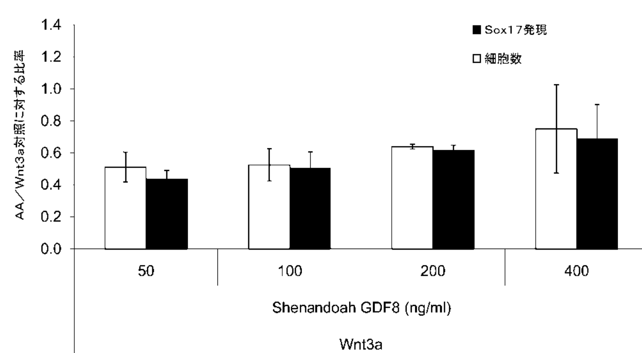
【図９Ａ】



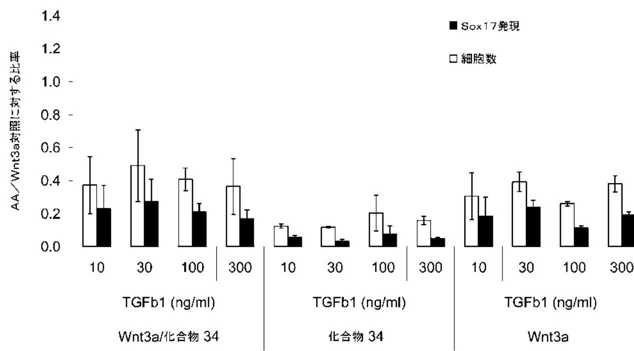
【図９Ｂ】



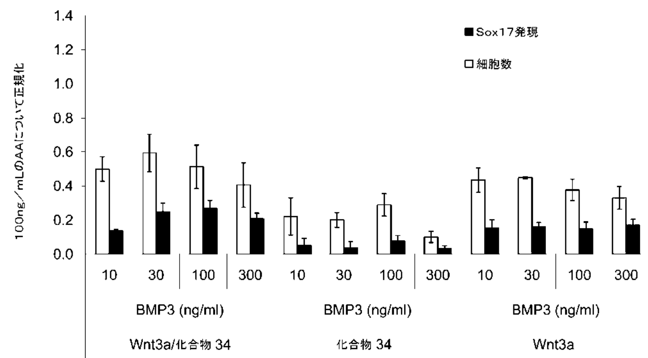
【図９Ｃ】



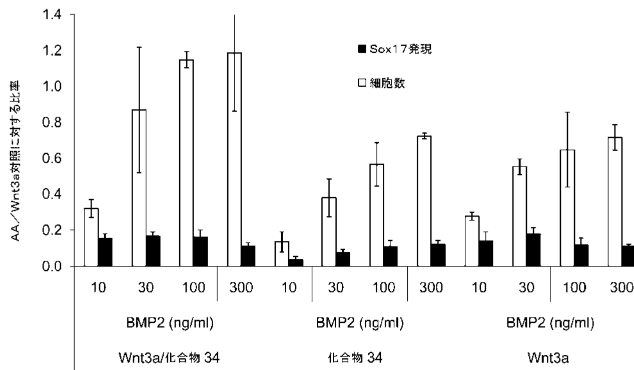
【図９Ｄ】



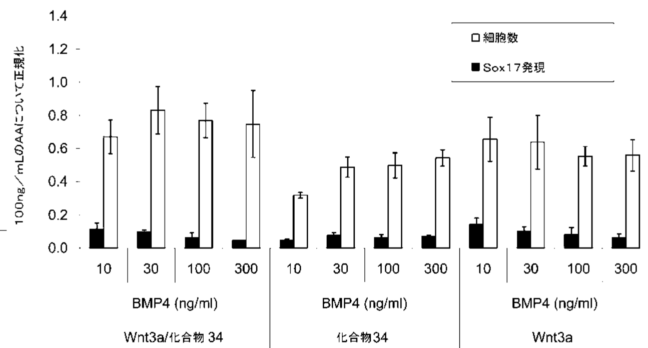
【図９Ｆ】



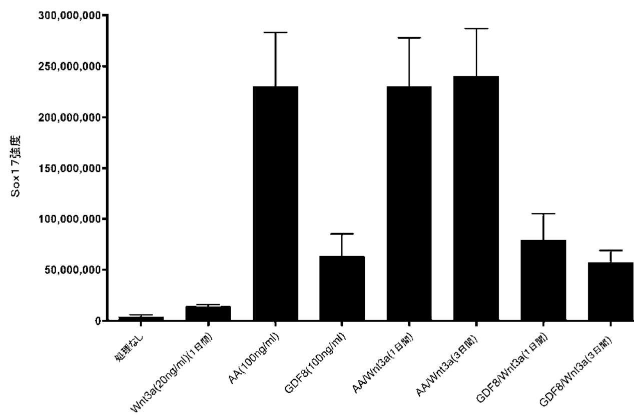
【図９Ｅ】



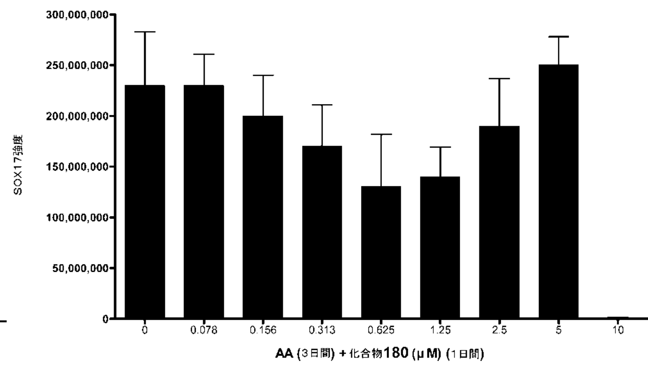
【図９Ｇ】



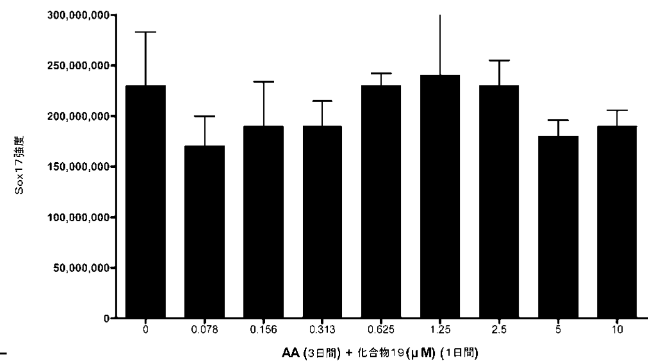
【図１０】



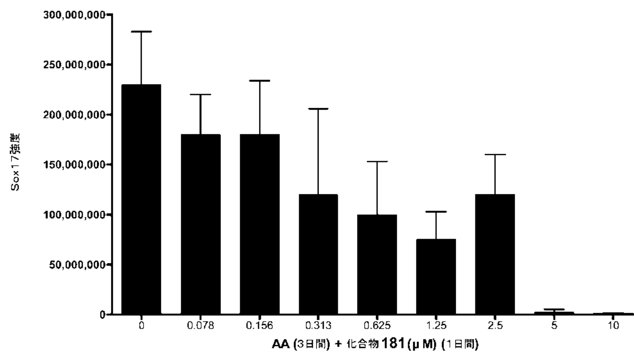
【図１１Ｂ】



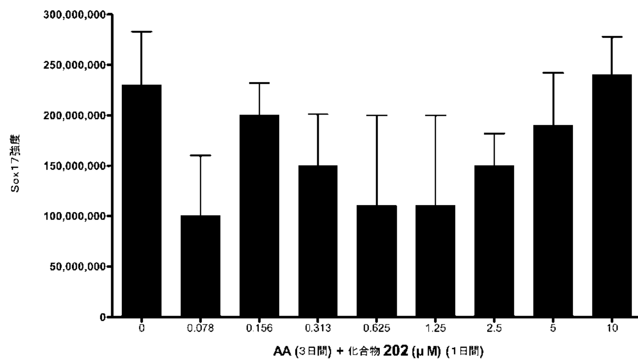
【図１１Ｃ】



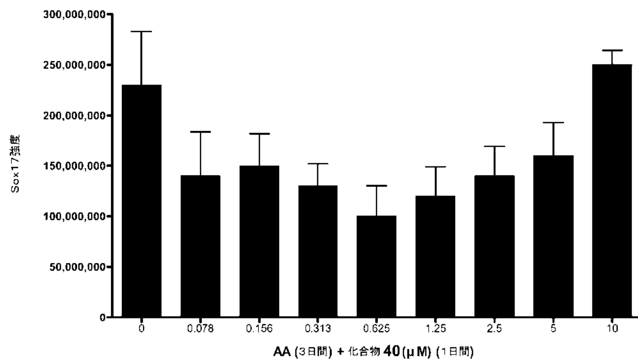
【図１１Ａ】



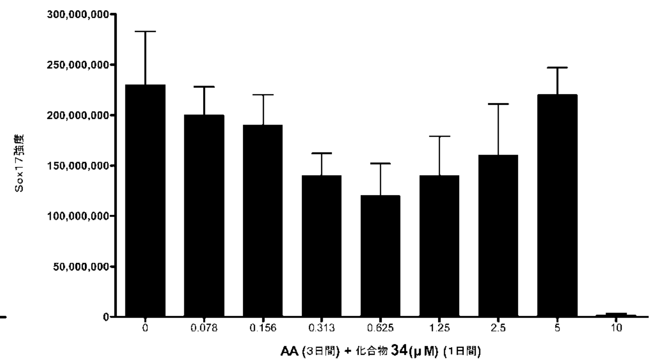
【図１１Ｄ】



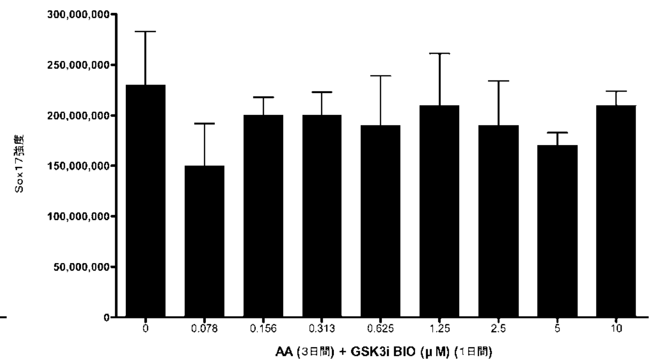
【図１１Ｅ】



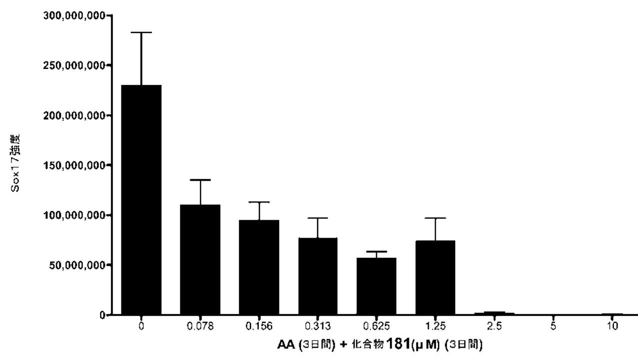
【図１１Ｆ】



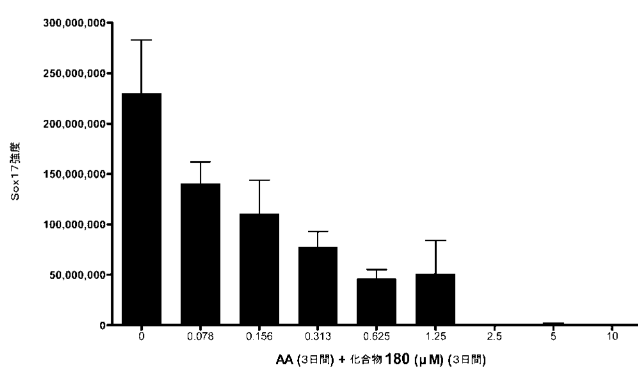
【図１１Ｇ】



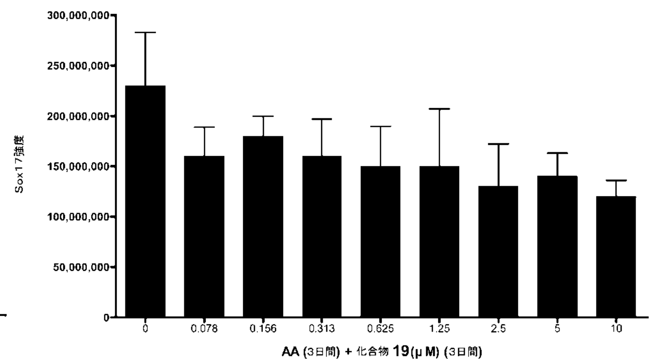
【図１２Ａ】



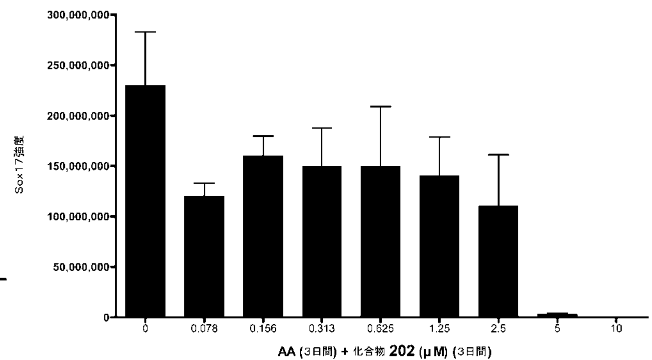
【図１２Ｂ】



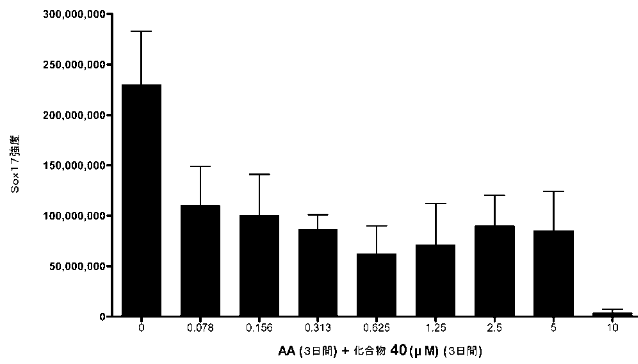
【図１２Ｃ】



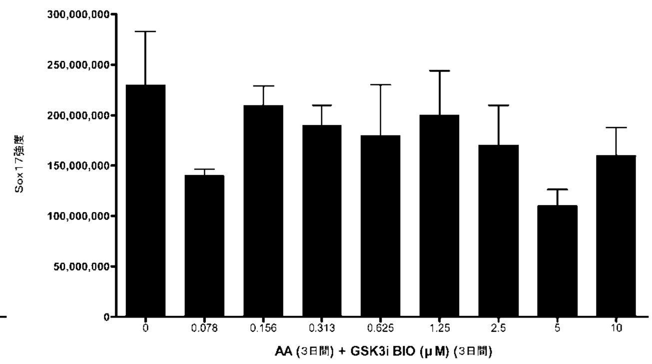
【図１２Ｄ】



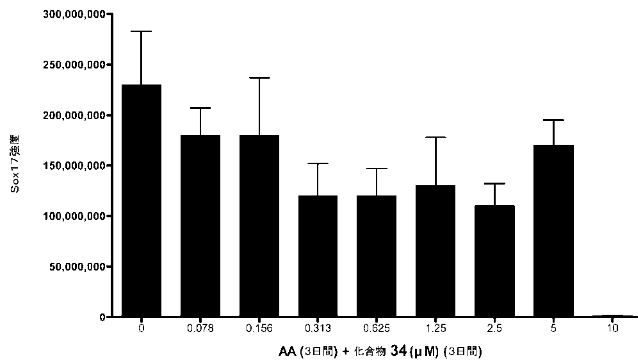
【図１２Ｅ】



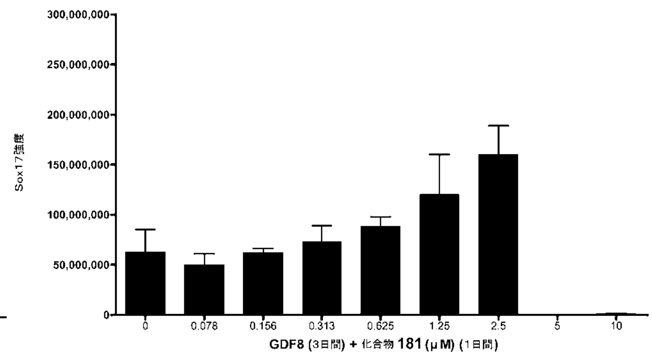
【図１２Ｇ】



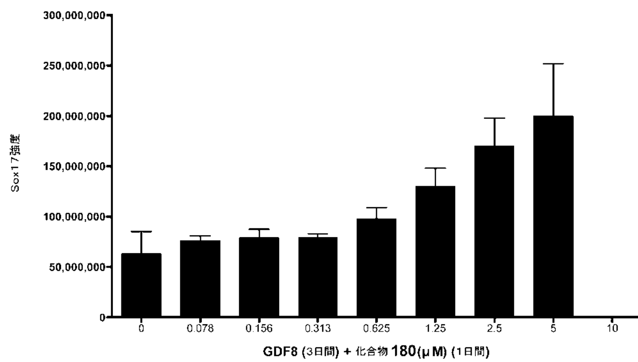
【図１２Ｆ】



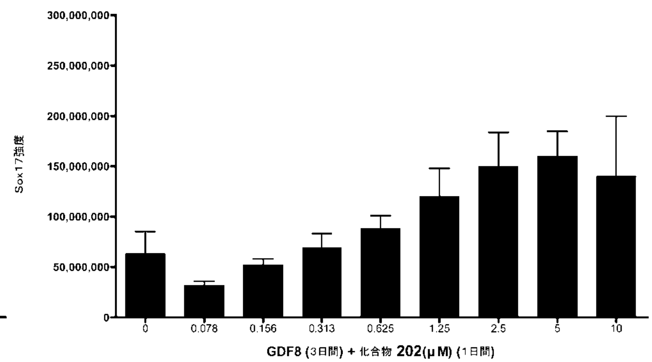
【図１３Ａ】



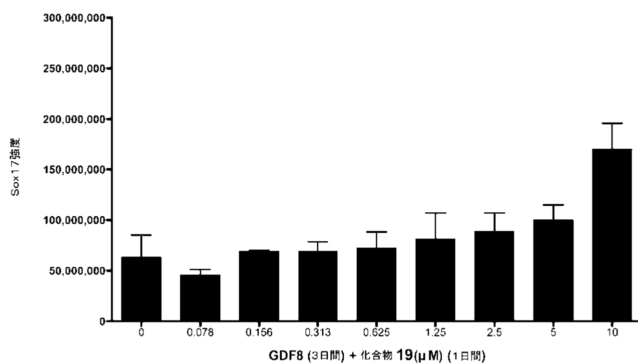
【図１３Ｂ】



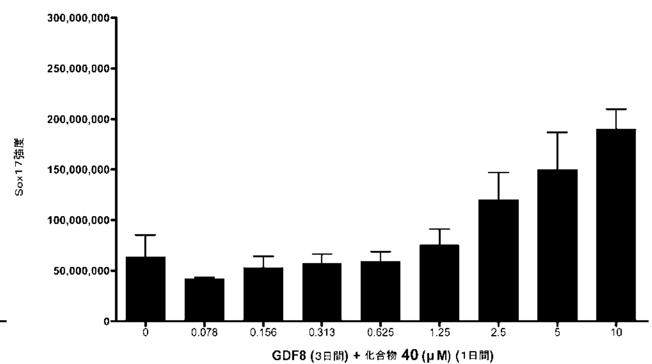
【図１３Ｄ】



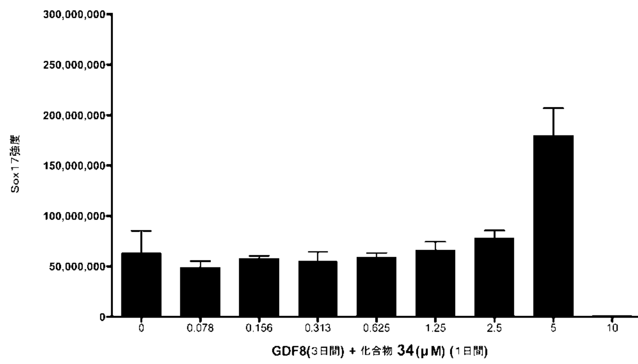
【図１３Ｃ】



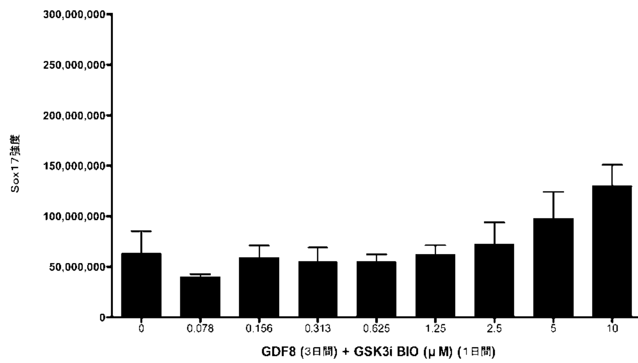
【図１３Ｅ】



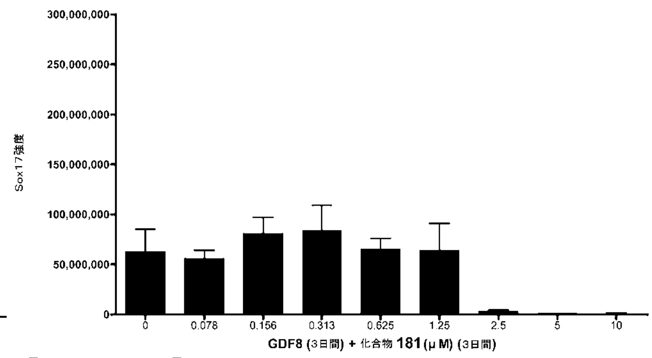
【図１３Ｆ】



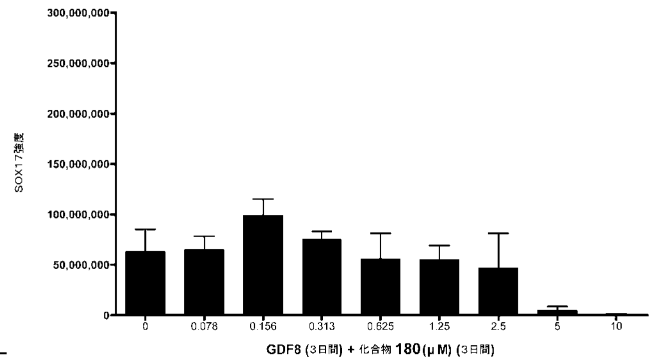
【図１３Ｇ】



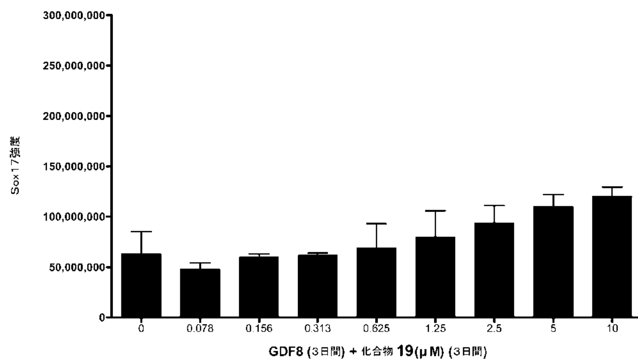
【図１４Ａ】



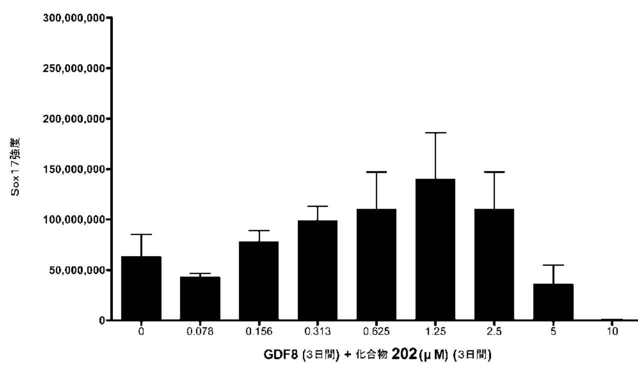
【図１４Ｂ】



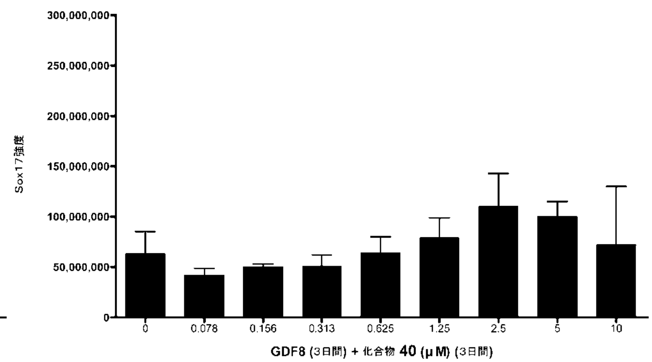
【図１４Ｃ】



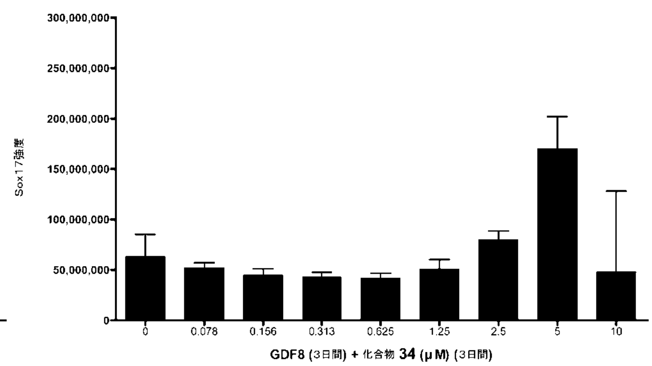
【図１４Ｄ】



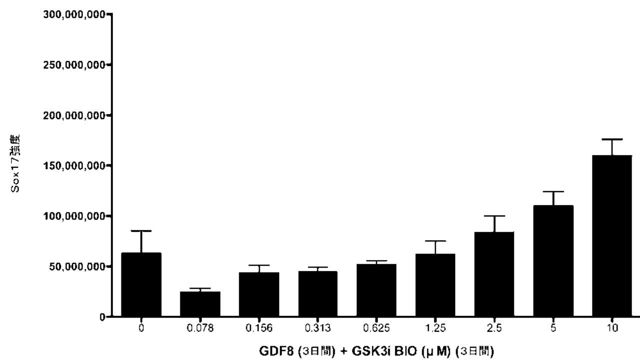
【図１４Ｅ】



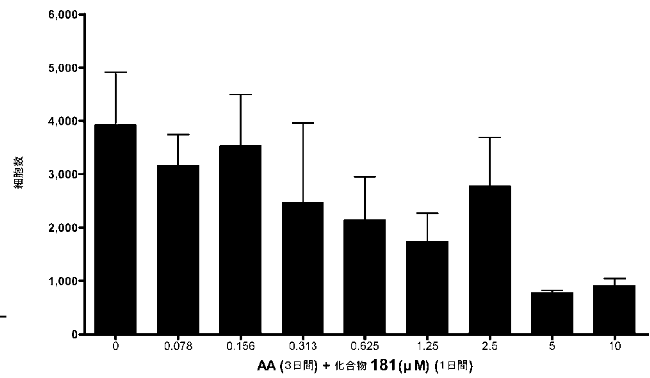
【図１４Ｆ】



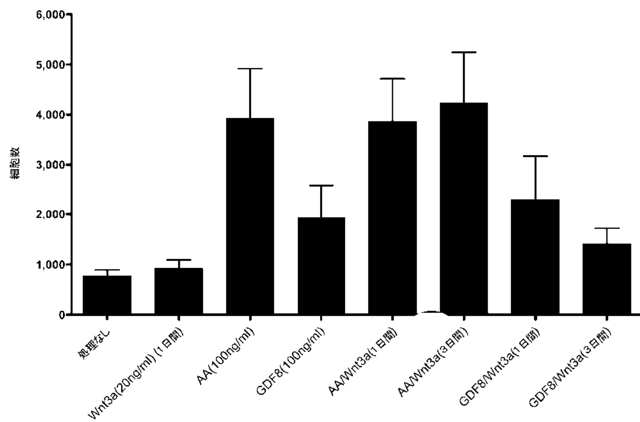
【図１４Ｇ】



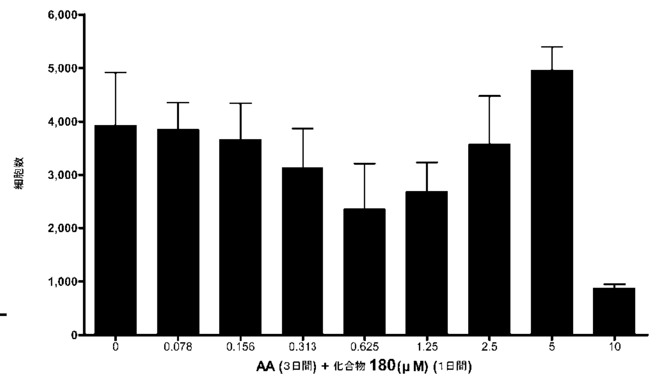
【図１６Ａ】



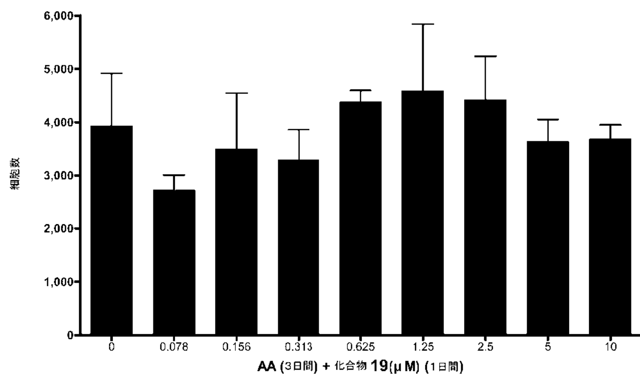
【図１５】



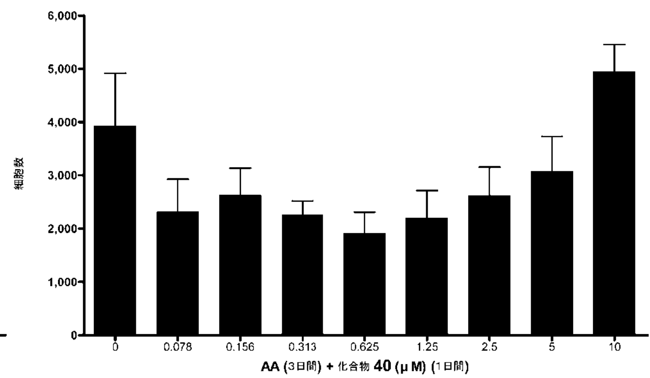
【図１６Ｂ】



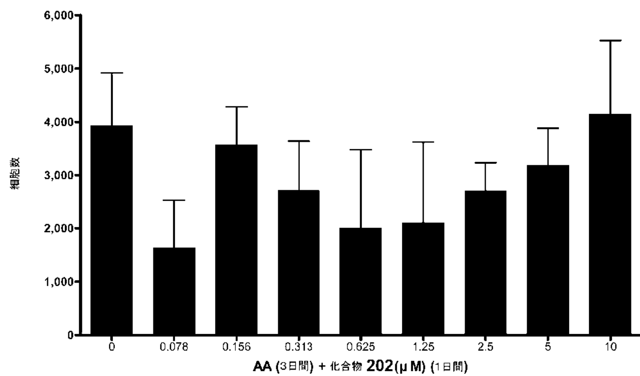
【図１６Ｃ】



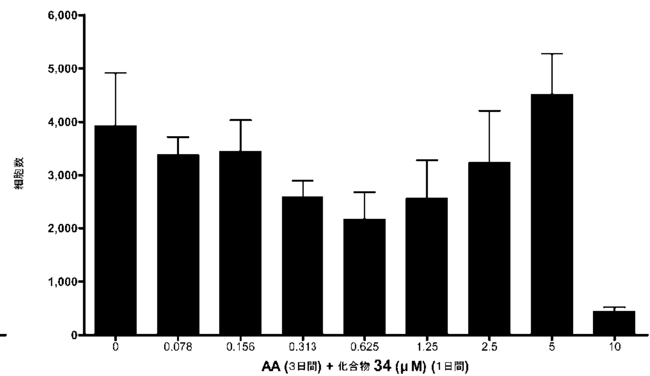
【図１６Ｅ】



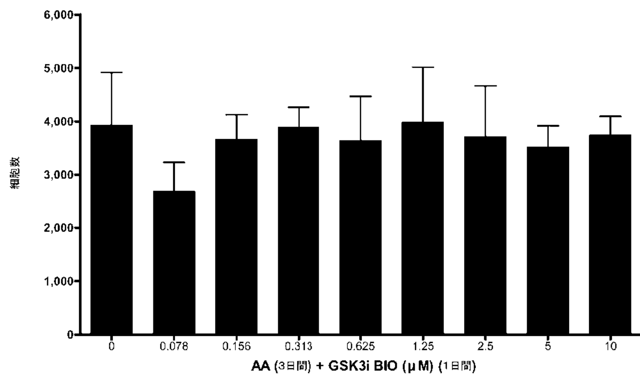
【図１６Ｄ】



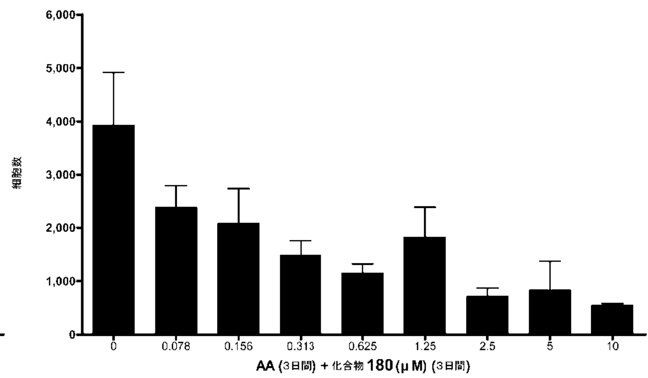
【図１６Ｆ】



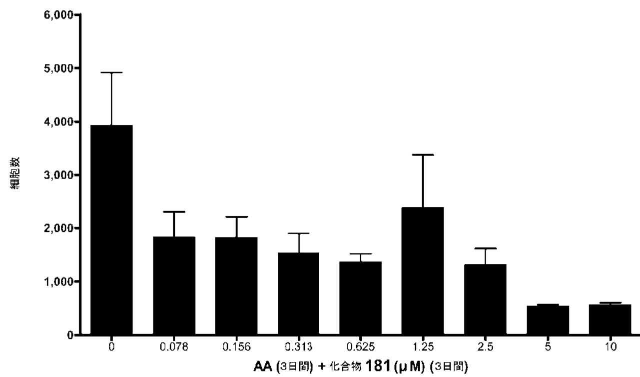
【図１６Ｇ】



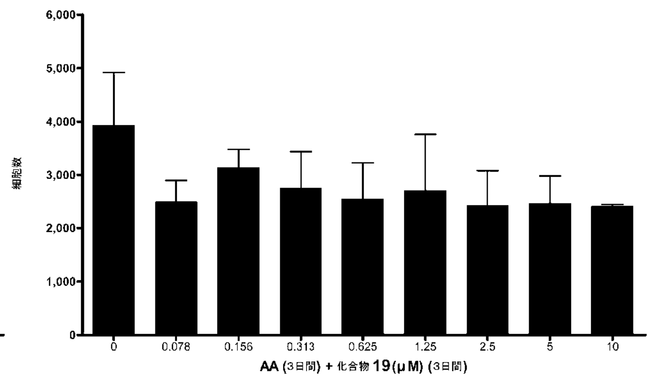
【図１７Ｂ】



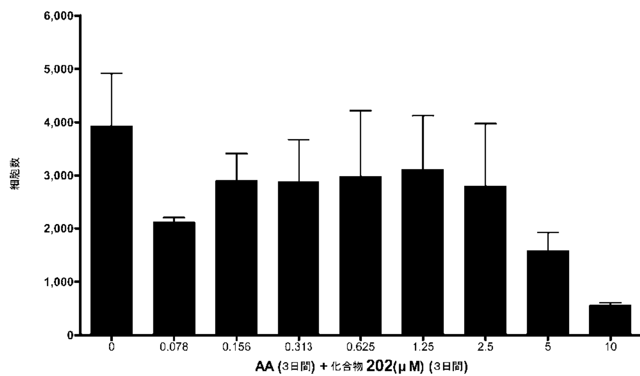
【図１７Ａ】



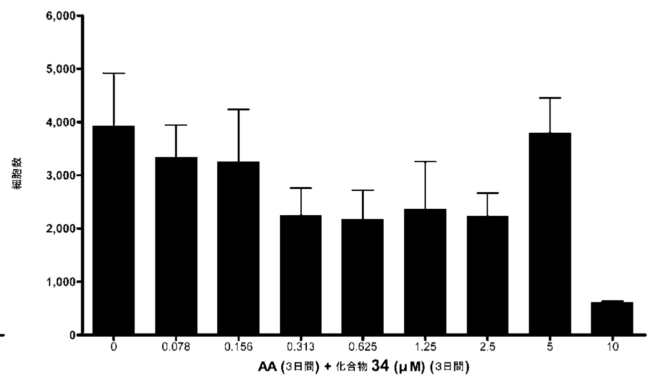
【図１７Ｃ】



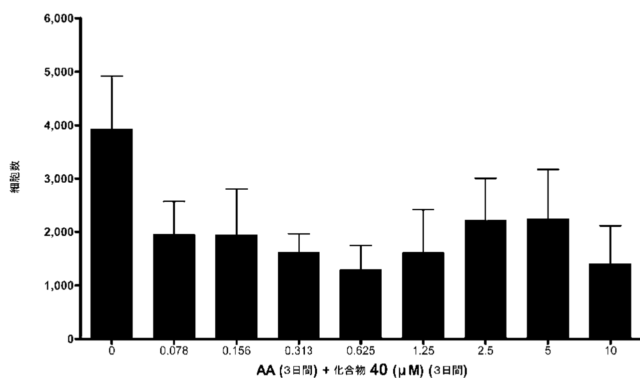
【図１７Ｄ】



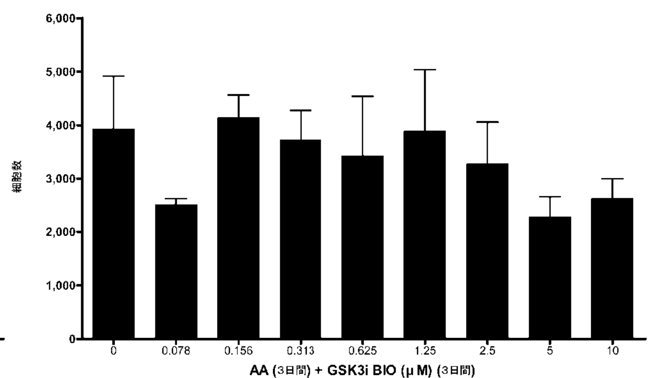
【図１７Ｆ】



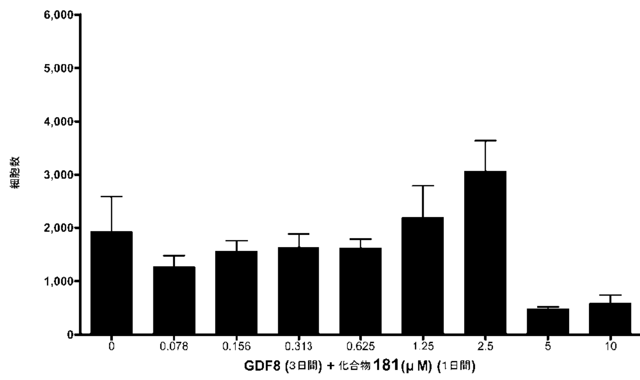
【図１７Ｅ】



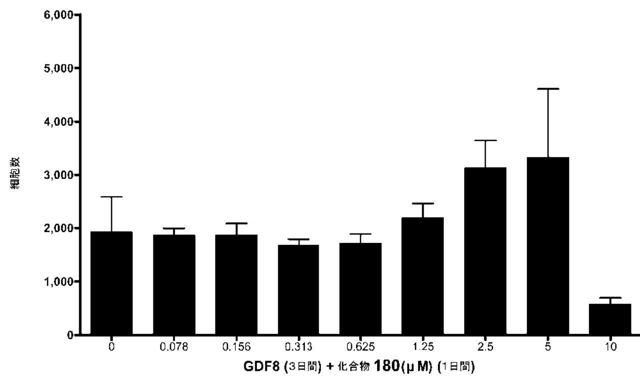
【図１７Ｇ】



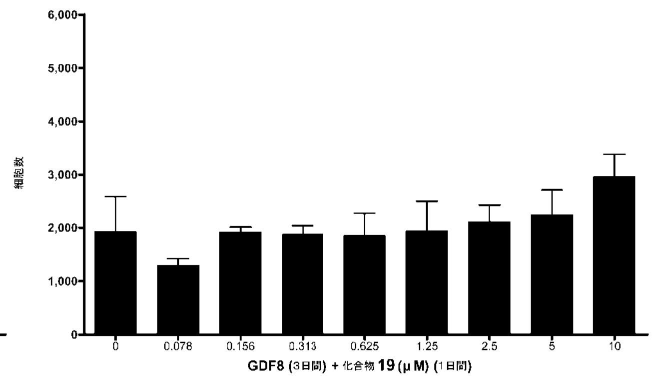
【図１８Ａ】



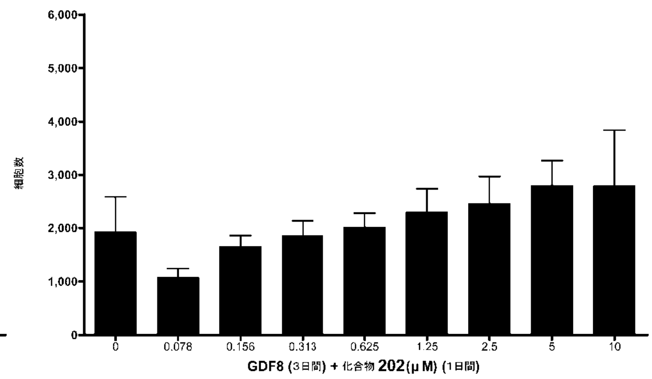
【図１８Ｂ】



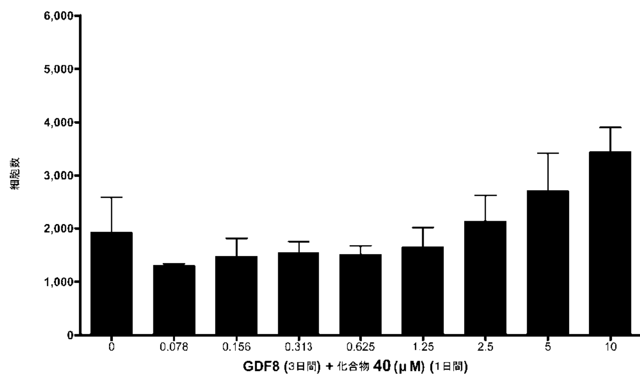
【図１８Ｃ】



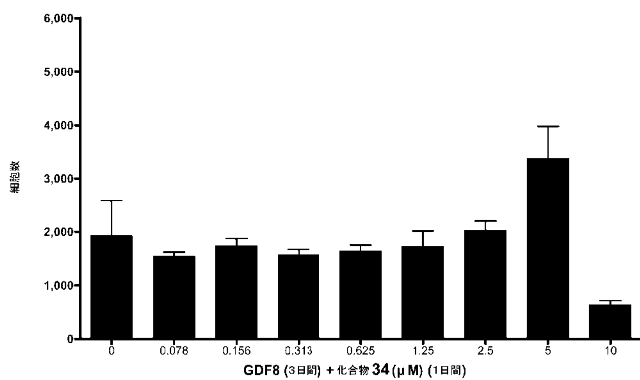
【図１８Ｄ】



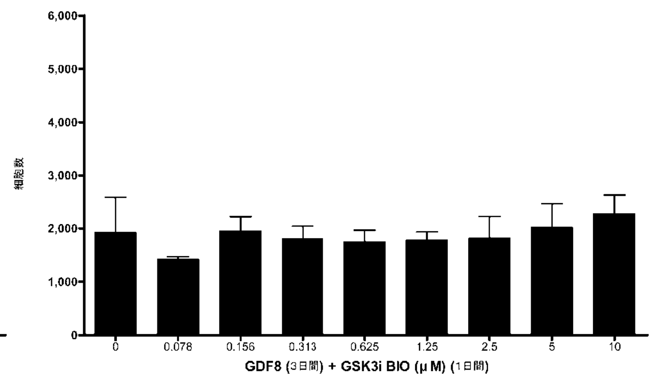
【図１８Ｅ】



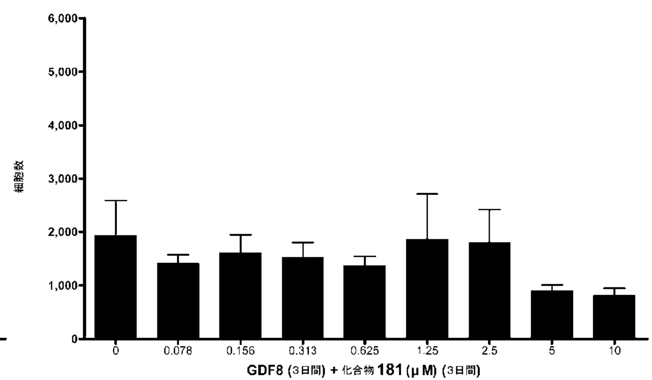
【図１８Ｆ】



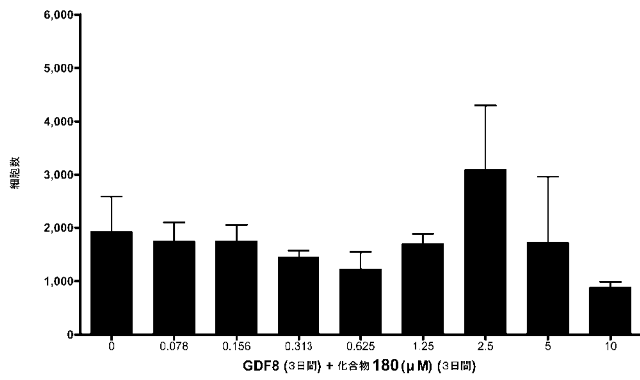
【図１８Ｇ】



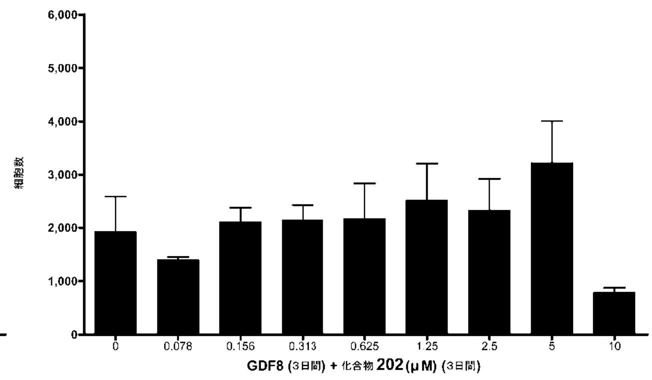
【図１９Ａ】



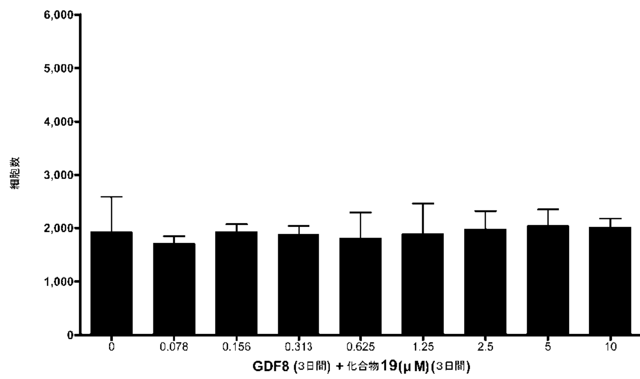
【図１９Ｂ】



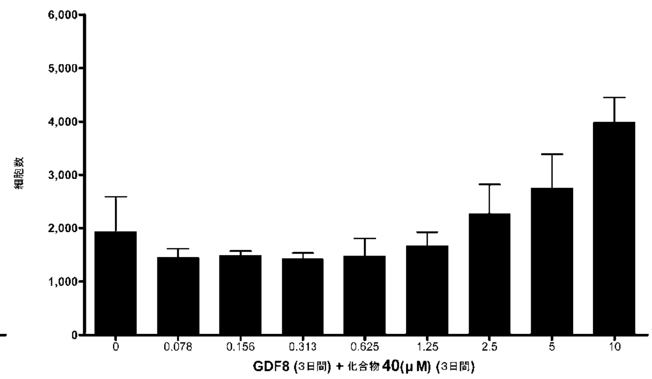
【図１９Ｄ】



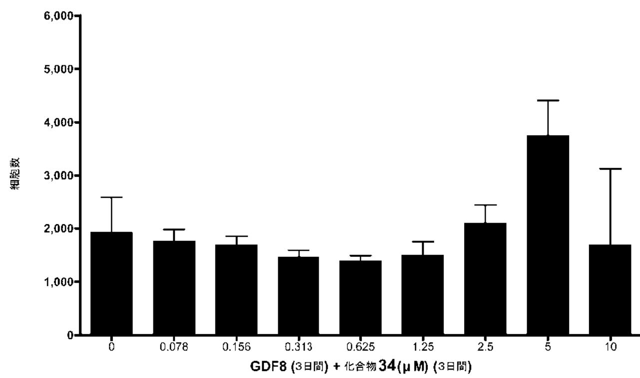
【図１９Ｃ】



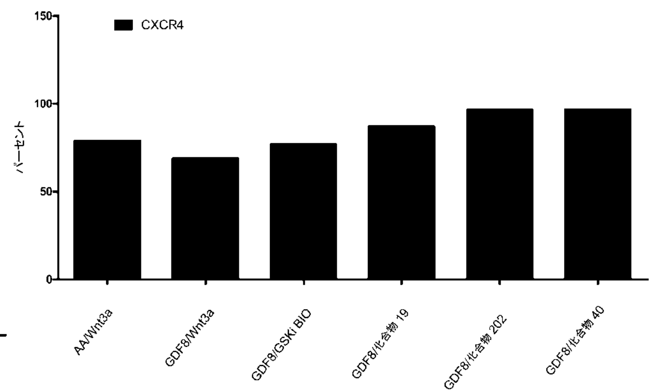
【図１９Ｅ】



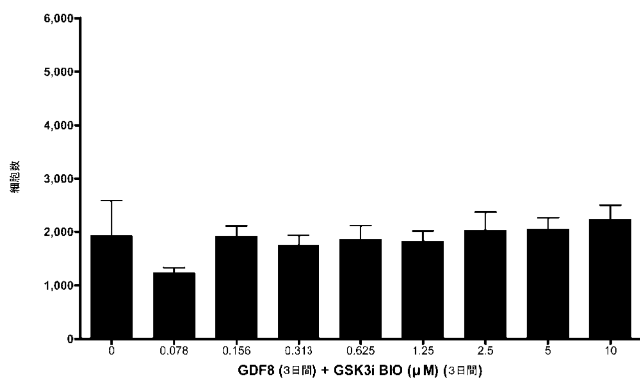
【図１９Ｆ】



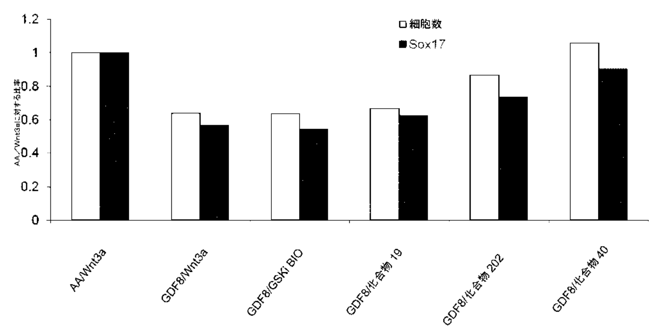
【図２０Ａ】



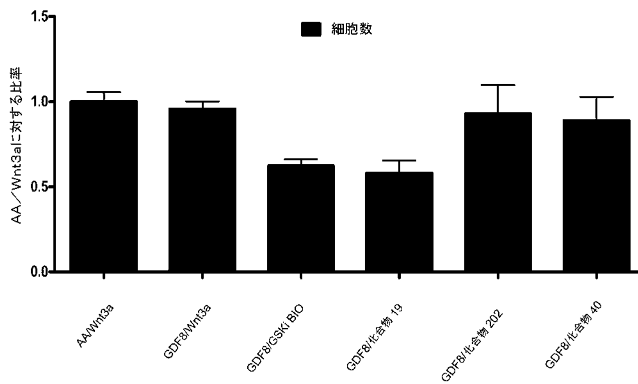
【図１９Ｇ】



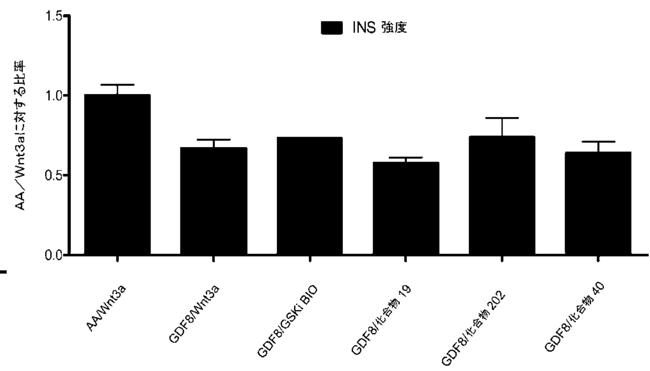
【図２０Ｂ】



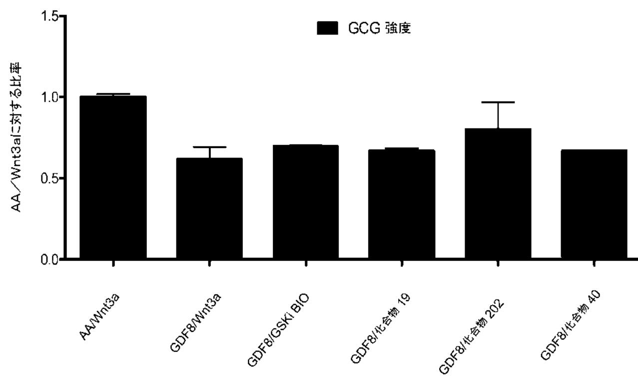
【図２０Ｃ】



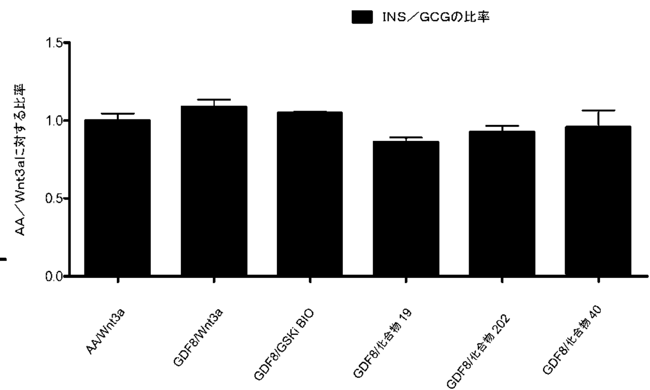
【図２０Ｅ】



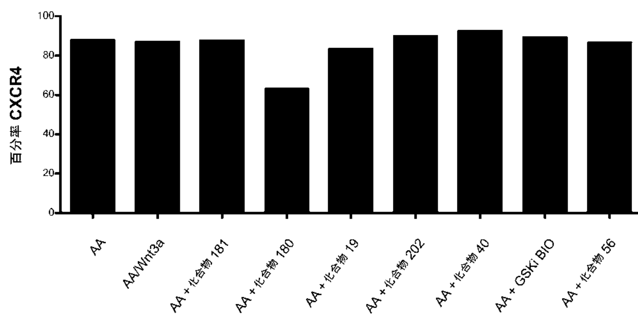
【図２０Ｄ】



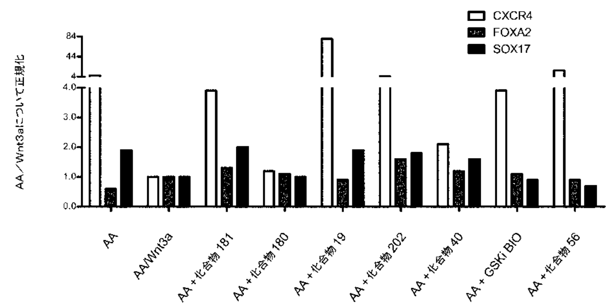
【図２０Ｆ】



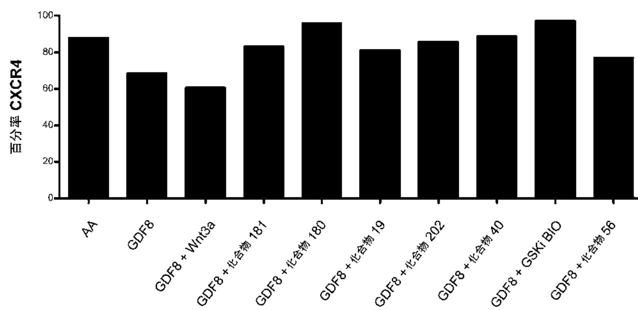
【図２１Ａ】



【図２１Ｃ】

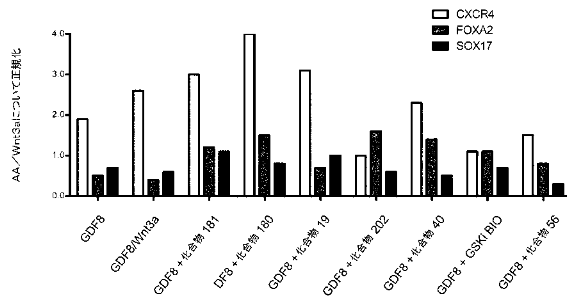


【図２１Ｂ】



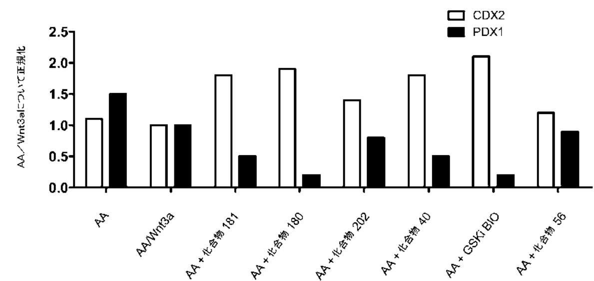
化合物\CT	GAPDH	CXCR4	FOXA2	SOX17
なし	19.4	20.4	25.1	21.6
Wnt3a	18.2	22.0	22.9	21.2
化合物 181	20.1	22.0	25.6	22.2
化合物 180	18.4	22.0	24.0	21.4
化合物 19	20.1	17.7	25.6	22.3
化合物 202	20.3	22.0	25.7	22.6
化合物 40	19.9	22.7	25.5	22.3
GSK3i IX(bio)	20.2	22.2	25.8	23.4
化合物 56	19.8	19.6	24.4	23.3

【図２１Ｄ】



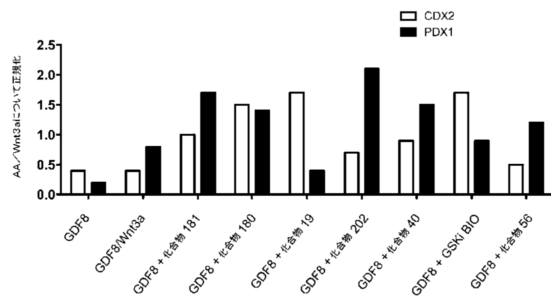
化合物\CT	GAPDH	CXCR4	FOXA2	SOX17
なし	21.6	24.6	25.9	25.2
Wnt3a	21.2	23.6	25.7	25.0
化合物 181	20.7	23.0	25.2	23.7
化合物 180	20.9	22.7	25.0	24.2
化合物 19	19.6	21.8	24.2	22.6
化合物 202	18.5	22.4	23.6	22.3
化合物 40	19.7	22.4	24.9	23.7
GSK3i IX(bio)	19.6	23.3	24.7	23.3
化合物 56	19.7	23.0	25.3	24.4

【図２１Ｅ】



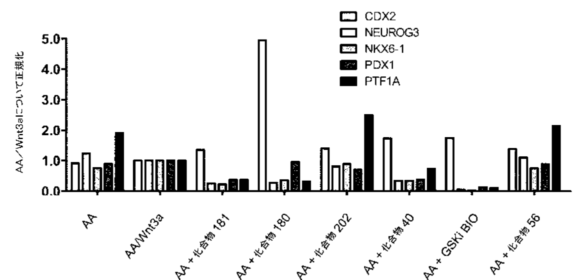
化合物\CT	GAPDH	CDX2	PDX1
なし	18.5	22.9	23.3
Wnt3a	18.4	23.0	23.8
化合物 181	18.6	22.3	25.0
化合物 180	18.8	22.5	26.3
化合物 202	18.5	22.5	24.1
化合物 40	18.5	22.2	24.8
GSK3i IX(bio)	18.5	22.0	26.1
化合物 56	18.3	22.7	23.9

【図２１Ｆ】



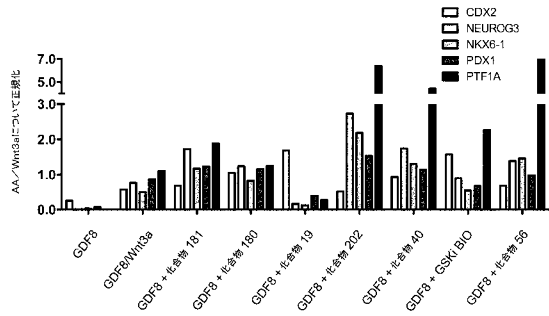
化合物\CT	GAPDH	CDX2	PDX1
なし	18.0	23.8	25.5
Wnt3a	17.4	23.1	23.1
化合物 181	18.8	23.4	23.5
化合物 180	18.8	22.8	23.7
化合物 19	18.3	22.0	25.0
化合物 202	18.7	23.8	23.0
化合物 40	18.4	23.0	23.2
GSK3i IX(bio)	18.4	22.2	24.0
化合物 56	18.2	23.8	23.3

【図２１Ｇ】



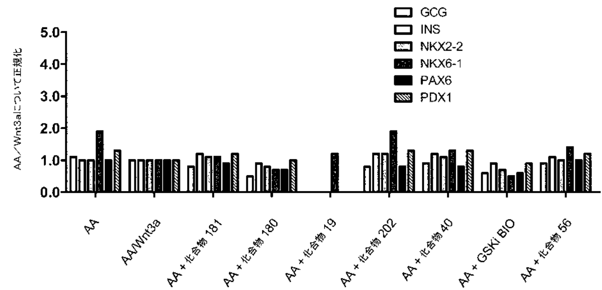
化合物\CT	GAPDH	CDX2	NEUROG3	NKX6-1	PDX1	PTF1A
なし	19.0	23.7	23.3	27.4	23.7	29.6
Wnt3a	19.5	24.1	24.1	27.5	24.1	31.1
化合物 181	18.0	22.1	24.6	28.1	24.0	31.0
化合物 180	19.4	21.6	25.8	28.9	24.0	32.6
化合物 202	19.2	23.3	24.1	27.4	24.3	29.5
化合物 40	19.2	22.9	25.3	28.7	25.1	31.2
GSK3i IX(bio)	19.0	22.7	27.7	32.9	26.5	33.7
化合物 56	18.8	22.9	23.3	27.2	23.6	29.3

【図２１Ｈ】



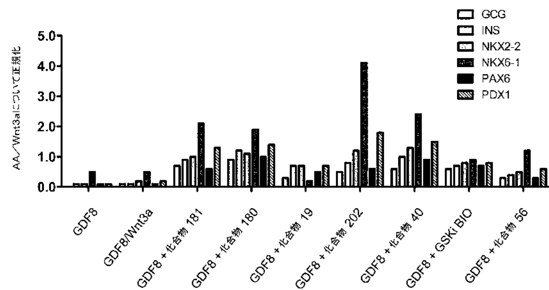
化合物\CT	GAPDH	CDX2	NEUROG3	NKX6-1	PDX1	PTF1A
なし	18.0	24.6	28.7	31.2	26.5	40.0
Wnt3a	19.0	24.4	24.0	28.0	23.8	30.5
化合物 181	18.0	23.1	21.8	25.7	22.3	28.6
化合物 180	19.5	23.9	23.7	27.7	23.8	30.7
化合物 19	19.1	22.9	26.4	30.2	25.1	32.6
化合物 202	19.0	24.5	22.2	25.9	23.0	27.9
化合物 40	19.0	23.6	22.7	26.6	23.4	28.4
GSK3i IX(bio)	19.1	23.0	23.8	27.9	24.2	29.5
化合物 56	18.9	24.0	23.0	26.3	23.5	27.7

【図２１Ｉ】



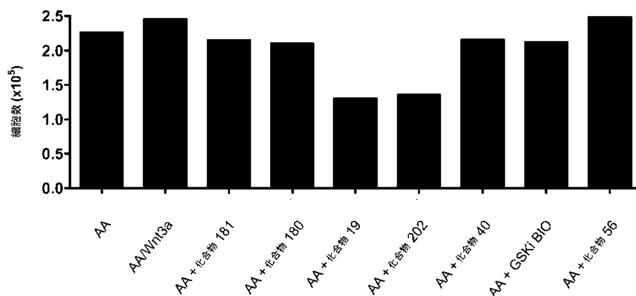
化合物\CT	GAPDH	GCG	INS	NKX2-2	NKX6-1	PAX6	PDX1
なし	18.3	14.1	14.9	23.7	25.5	24.0	23.2
Wnt3a	18.0	14.0	14.6	23.4	26.1	23.7	23.3
化合物 181	18.0	14.3	14.5	23.3	26.1	24.0	23.1
化合物 180	18.0	14.9	14.7	23.8	26.5	24.3	23.2
化合物 19	17.9	27.0	26.9	28.0	25.8	28.6	29.4
化合物 202	18.6	14.9	15.0	23.7	25.8	24.7	23.6
化合物 40	18.3	14.6	14.7	23.5	26.1	24.4	23.2
GSK3i IX(bio)	18.3	15.1	15.1	24.2	27.5	24.9	23.8
化合物 56	18.2	14.4	14.8	23.6	25.9	24.1	23.3

【図２１Ｊ】

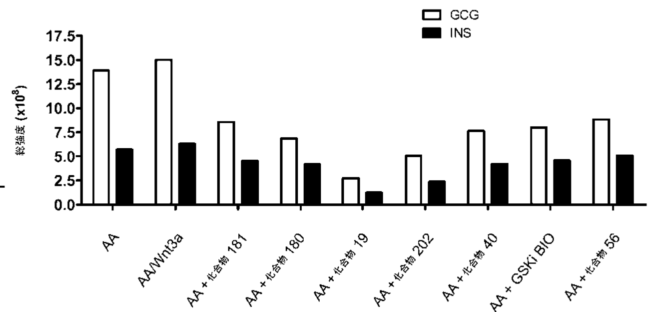


化合物\CT	GAPDH	GCG	INS	NKX2-2	NKX6-1	PAX6	PDX1
なし	17.4	18.1	17.7	25.9	26.6	26.6	25.6
Wnt3a	17.8	17.7	17.5	25.6	27.0	26.5	25.6
化合物 181	18.0	14.5	14.8	23.4	25.0	24.4	23.0
化合物 180	18.0	14.2	14.4	23.2	25.1	23.8	22.9
化合物 19	18.3	16.2	15.6	24.3	28.6	25.2	24.2
化合物 202	18.7	15.7	15.8	23.8	24.8	25.2	23.2
化合物 40	18.1	14.8	14.8	23.2	25.0	24.1	22.9
GSK3i IX(bio)	18.4	15.2	15.5	24.2	26.7	24.8	24.0
化合物 56	18.0	16.0	16.0	24.4	25.9	25.4	24.0

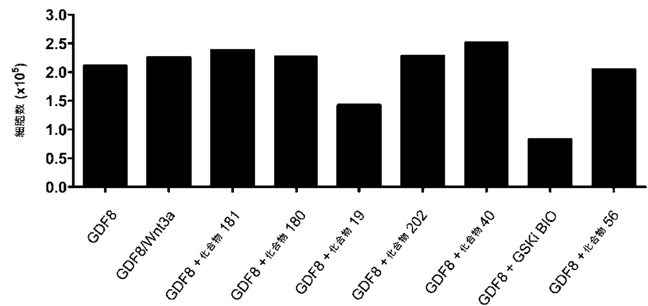
【図２１Ｋ】



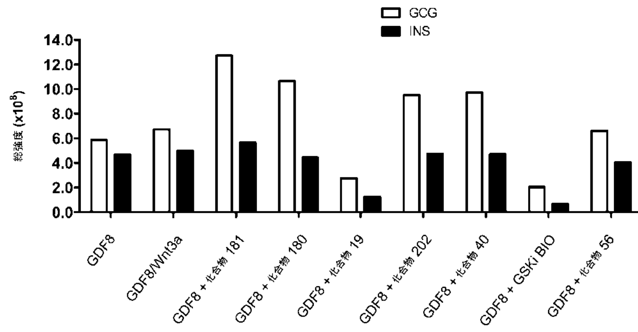
【図２１Ｌ】



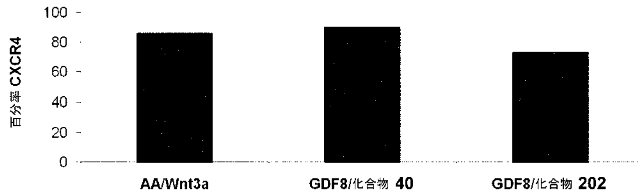
【図２１Ｍ】



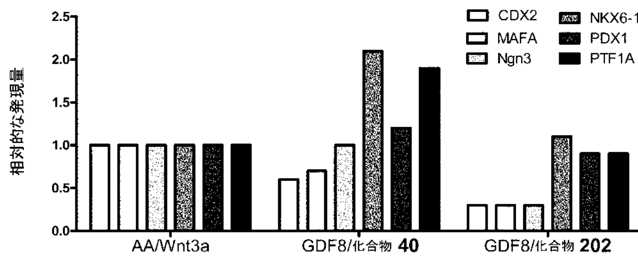
【図２１Ｎ】



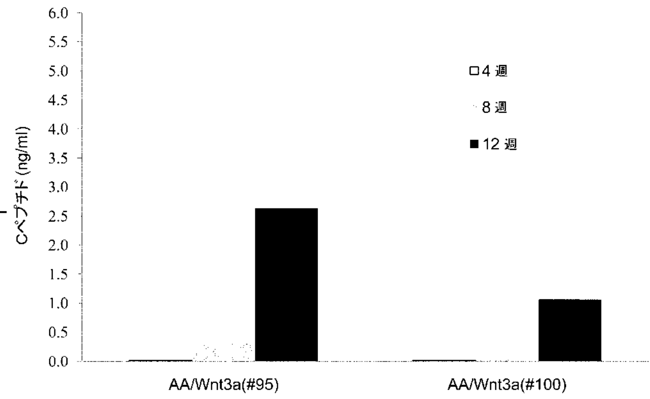
【図２２Ａ】



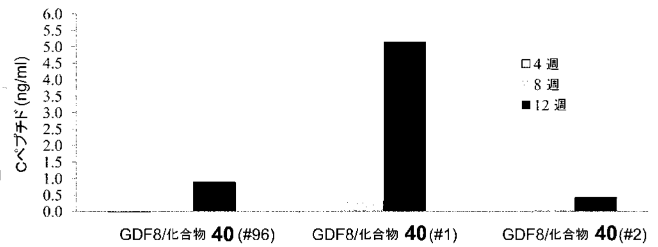
【図２２Ｂ】



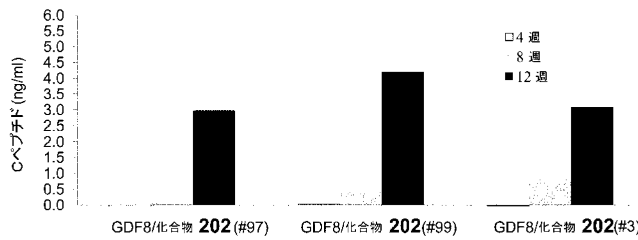
【図２３Ａ】



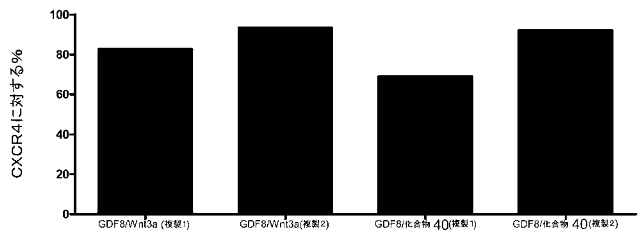
【図２３Ｂ】



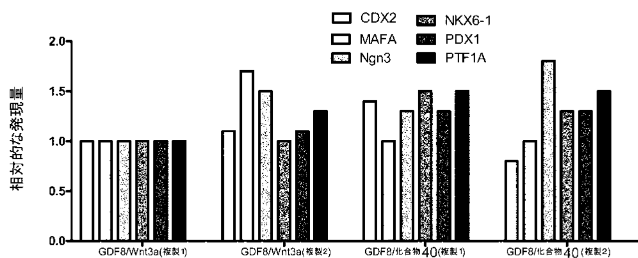
【図２３Ｃ】



【図２４Ａ】

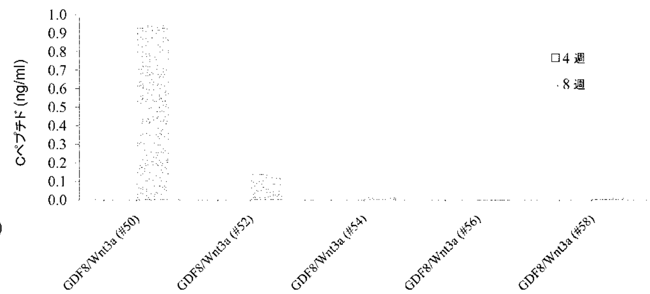


【図２４Ｂ】

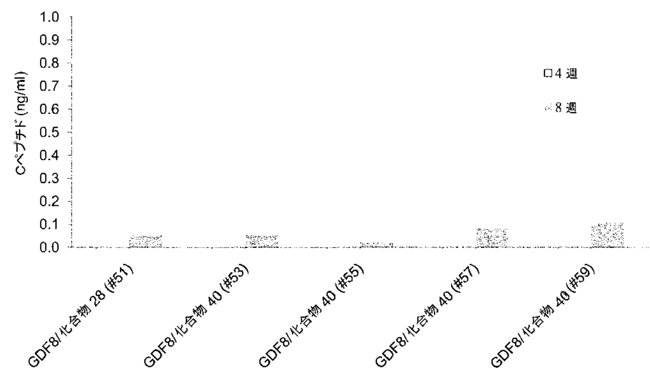


処理\CTs	GAPDH	CDX2	MAFA	NEUROG3	NKX6-1	PDX1	PTF1A
GDF8/Wnt3a (複製1)	19.0	24.8	31.0	24.1	24.3	22.5	25.4
GDF8/Wnt3a (複製2)	18.6	24.3	29.8	23.1	23.9	22.0	24.7
GDF8/化合物 40 (複製1)	19.3	24.6	31.3	23.9	24.0	22.3	25.0
GDF8/化合物 40 (複製2)	18.7	24.9	30.6	22.9	23.7	21.8	24.5

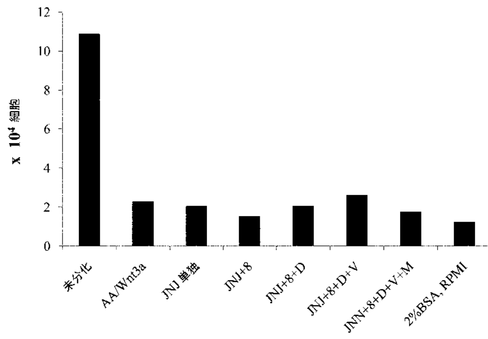
【図２４Ｃ】



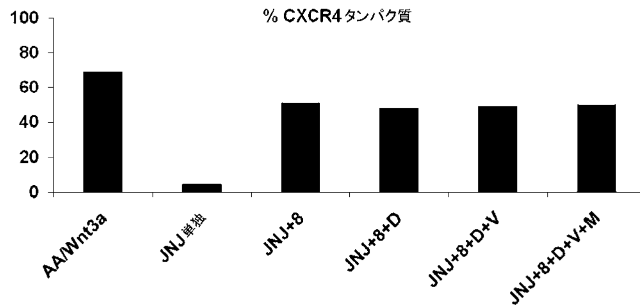
【図２４Ｄ】



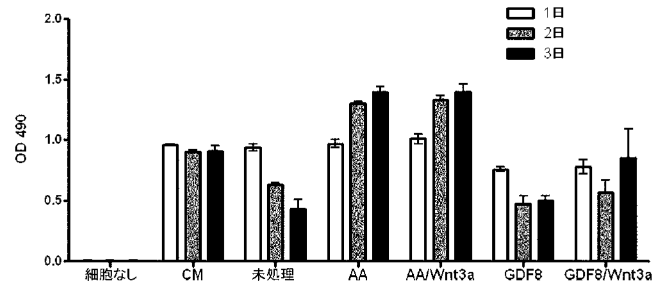
【図２５Ａ】



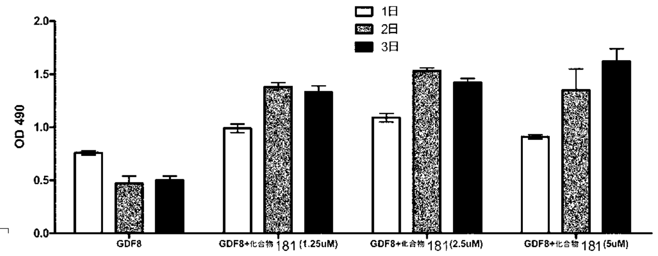
【図２５Ｂ】



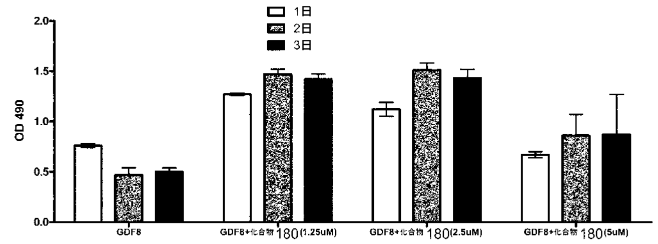
【図２６Ａ】



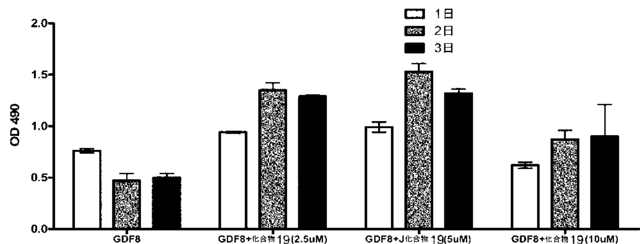
【図２６Ｂ】



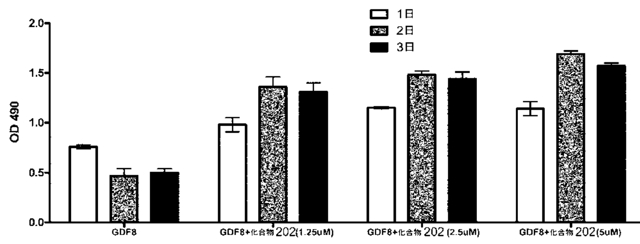
【図２６Ｃ】



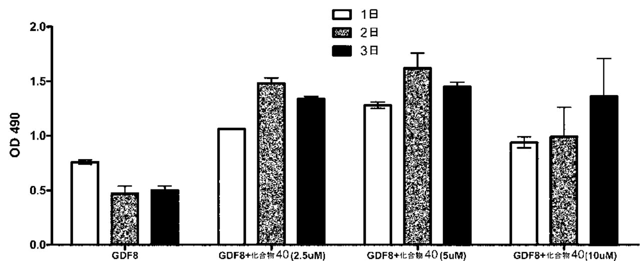
【図２６Ｄ】



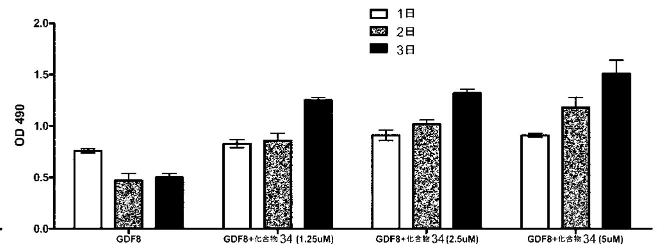
【図２６Ｅ】



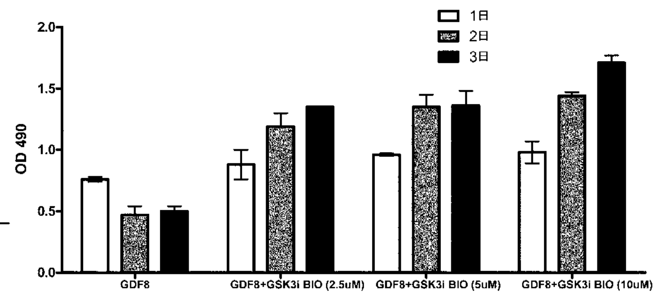
【図２６Ｆ】



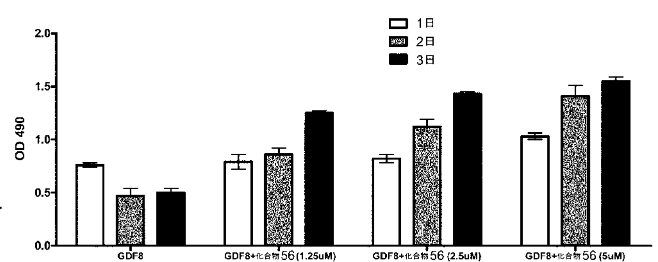
【図２６Ｇ】



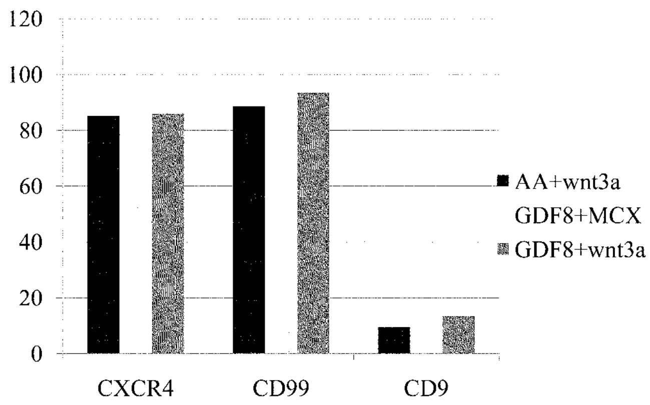
【図２６Ｈ】



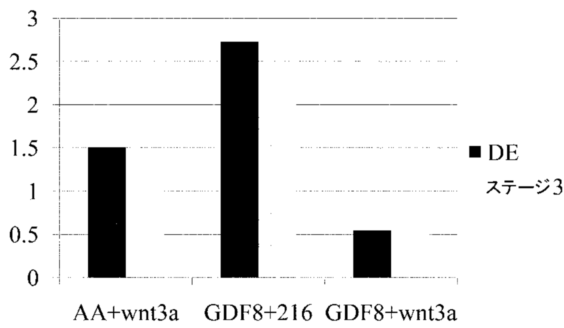
【図２６Ｉ】



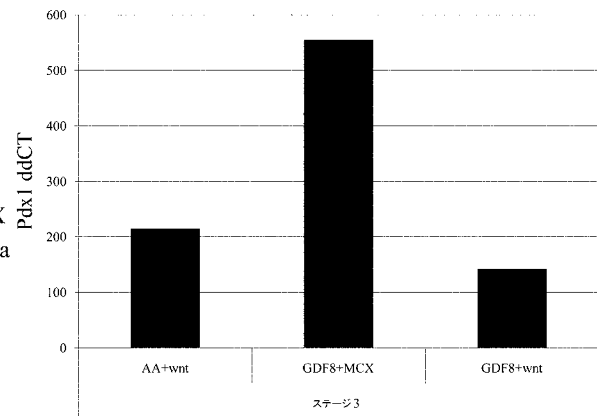
【図２７Ａ】



【図２７Ｂ】



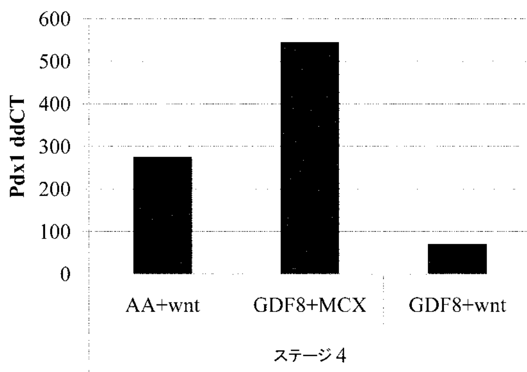
【図２７Ｃ】



【図２７Ｄ】

ステージ 3	AA+wnt	GDF8+MCX	GDF8+wnt
Pdx	215	555	142
Cdx2	1614	1567	965
HNF4a	339	210	267

【図２７Ｅ】



【図２７Ｆ】

ステージ 4	AA+wnt	GDF8+MCX	GDF8+wnt
Pdx	276	545	71
Cdx2	1971	2496	983
HNF4a	640	426	609

【国際調査報告】

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No
PCT/US2009/049183

A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER
INV. C12N5/06

According to International Patent Classification (IPC) or to both national classification and IPC

B. FIELDS SEARCHED

Minimum documentation searched (classification system followed by classification symbols)
C12N

Documentation searched other than minimum documentation to the extent that such documents are included in the fields searched

Electronic data base consulted during the international search (name of data base and, where practical, search terms used)

EPO-Internal, BIOSIS, EMBASE, WPI Data

C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
X	MCLEAN AMANDA B ET AL: "Activin a efficiently specifies definitive endoderm from human embryonic stem cells only when phosphatidylinositol 3-kinase signaling is suppressed" STEM CELLS, ALPHAMED PRESS, DAYTON, OH, US, vol. 25, no. 1, 1 January 2007 (2007-01-01), pages 29-38, XP002482637 ISSN: 1066-5099 abstract page 32 - page 33 figure 3 -----	1

-/--

[X] Further documents are listed in the continuation of Box C.

[X] See patent family annex.

* Special categories of cited documents :

"A" document defining the general state of the art which is not considered to be of particular relevance
"E" earlier document but published on or after the international filing date
"L" document which may throw doubts on priority claim(s) or which is cited to establish the publication date of another citation or other special reason (as specified)
"O" document referring to an oral disclosure, use, exhibition or other means
"P" document published prior to the international filing date but later than the priority date claimed

"T" later document published after the international filing date or priority date and not in conflict with the application but cited to understand the principle or theory underlying the invention
"X" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered novel or cannot be considered to involve an inventive step when the document is taken alone
"Y" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered to involve an inventive step when the document is combined with one or more other such documents, such combination being obvious to a person skilled in the art.
"&" document member of the same patent family

Date of the actual completion of the international search	Date of mailing of the international search report
30 October 2009	11/11/2009
Name and mailing address of the ISA/ European Patent Office, P.B. 5818 Patentlaan 2 NL - 2280 HV Rijswijk Tel. (+31-70) 340-2040, Fax: (+31-70) 340-3016	Authorized officer Brero, Alessandro

Form PCT/ISA/210 (second sheet) (April 2005)

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No
PCT/US2009/049183

C(Continuation). DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
X	WO 2008/048647 A (CYTHERA INC [US]; BAETGE EMMANUEL EDWARD [US]; D AMOUR KEVIN [US]) 24 April 2008 (2008-04-24) claims 116,123 paragraphs [0173], [0260], [0293]	1
A	ARMSTRONG LYLE ET AL: "The role of PI3K/AKT, MAPK/ERK and NF kappa beta signalling in the maintenance of human embryonic stem cell pluripotency and viability highlighted by transcriptional profiling and functional analysis" HUMAN MOLECULAR GENETICS, OXFORD UNIVERSITY PRESS, SURREY, vol. 15, no. 11, 1 June 2006 (2006-06-01), pages 1894-1913, XP002471543 ISSN: 0964-6906 the whole document	1,2
A	PALING N R D ET AL: "REGULATION OF EMBRYONIC STEM CELL SELF-RENEWAL BY PHOSPHOINOSITIDE 3-KINASE-DEPENDENT SIGNALING" JOURNAL OF BIOLOGICAL CHEMISTRY, AMERICAN SOCIETY OF BIOLOCHEMICAL BIOLOGISTS, BIRMINGHAM, US, vol. 279, no. 46, 24 August 2004 (2004-08-24), pages 48063-48070, XP002380573 ISSN: 0021-9258 the whole document	1,2
A	HORI YUICHI ET AL: "Growth inhibitors promote differentiation of insulin-producing tissue from embryonic stem cells" PROCEEDINGS OF THE NATIONAL ACADEMY OF SCIENCES OF USA, NATIONAL ACADEMY OF SCIENCE, WASHINGTON, DC, US, vol. 99, no. 25, 10 December 2002 (2002-12-10), pages 16105-16110, XP002392968 ISSN: 0027-8424 cited in the application the whole document	1,2
A	MCKIERNAN EADAOIN ET AL: "Directed differentiation of mouse embryonic stem cells into pancreatic-like or neuronal- and glial-like phenotypes." TISSUE ENGINEERING OCT 2007, vol. 13, no. 10, October 2007 (2007-10), pages 2419-2430, XP002547893 ISSN: 1076-3279 the whole document	1,2

-/--

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No
PCT/US2009/049183

C(Continuation). DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
A	SHIRAKI NOBUAKI ET AL: "Guided differentiation of embryonic stem cells into Pdx1-expressing regional-specific definitive endoderm." STEM CELLS (DAYTON, OHIO) APR 2008, vol. 26, no. 4, April 2008 (2008-04), pages 874-885, XP002547894 ISSN: 1549-4918 the whole document -----	1,2
A	KUBO A ET AL: "Development of definitive endoderm from embryonic stem cells in culture" DEVELOPMENT, COMPANY OF BIOLOGISTS, CAMBRIDGE, GB, vol. 131, no. 7, 1 April 2004 (2004-04-01), pages 1651-1662, XP002985523 ISSN: 0950-1991 the whole document -----	1,2

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

Information on patent family members

International application No
PCT/US2009/049183

Patent document cited in search report	Publication date	Patent family member(s)	Publication date
WO 2008048647 A	24-04-2008	NONE	

フロントページの続き

(81)指定国　AP(BW,GH,GM,KE,LS,MW,MZ,NA,SD,SL,SZ,TZ,UG,ZM,ZW),EA(AM,AZ,BY,KG,KZ,MD,RU,TJ,TM),EP(AT,BE,BG,CH,CY,CZ,DE,DK,EE,ES,FI,FR,GB,GR,HR,HU,IE,IS,IT,LT,LU,LV,MC,MK,MT,NL,NO,PL,PT,RO,SE,SI,SK,TR),OA(BF,BJ,CF,CG,CI,CM,GA,GN,GQ,GW,ML,MR,NE,SN,TD,TG),AE,AG,AL,AM,AO,AT,AU,AZ,BA,BB,BG,BH,BR,BW,BY,BZ,CA,CH,CL,CN,CO,CR,CU,CZ,DE,DK,DM,DO,DZ,EC,EE,EG,ES,FI,GB,GD,GE,GH,GM,GT,HN,HR,HU,ID,IL,IN,IS,JP,KE,KG,KM,KN,KP,KR,KZ,LA,LC,LK,LR,LS,LT,LU,LY,MA,MD,ME,MG,MK,MN,MW,MX,MY,MZ,NA,NG,NI,NO,NZ,OM,PE,PG,PH,PL,PT,RO,RS,RU,SC,SD,SE,SG,SK,SL,SM,ST,SV,SY,TJ,TM,TN,TR,TT,TZ,UA,UG,US,UZ,VC,VN,ZA,ZM,ZW

(72)発明者　デイビス，ジヤネツト
アメリカ合衆国ニユージヤージイ州０８５５８スキルマン・グランドビユーロード１９９
(72)発明者　パーメンター，クリステイン
アメリカ合衆国カリフオルニア州９２１２１－１１２６サンデイエゴ・メリーフイールドロウ３２１０
(72)発明者　ボネ，パスカル・ギスラン・アンドレ
ベルギー・ビー－２３４０ビールセ・トウルンホウトセベーク３０・ジヤンセン・フアーマシユーチカ・ナームローゼ・フエンノートシヤツプ

Ｆターム(参考) 4B065 AA90X BA23 BB31 BB34 BB40 CA44